

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE**



/diplomová práce/

**ĚKOTOXIKOLOGICKÝ SCREENING VYBRANÉHO ANTIBIOTIKA**

**ECOTOXICOLOGICAL SCREENING OF THE SELECT ANTIBIOTIC**

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

**Hradec Králové 2008**

**Zuzana Psohlavcová**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Zuzana Psohlavcová

Děkuji Mgr. Jitce Vytlačilové za odborné vedení, pomoc se zpracováním výsledků, poskytnutí materiálů a všechny cenné rady a připomínky při psaní mé diplomové práce.

Obsah	4
<b>1. ÚVOD</b>	7
1.1 Cíl práce	9
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	11
2.1 Ekotoxikologie	12
2.2 Ekotoxikologické biotesty	14
2.2.1 Testování bakteriální toxicity	16
2.2.2 Akvatické testy toxicity	17
2.2.2.1 <i>Akutní testy toxicity</i>	18
2.2.2.2 <i>Chronické testy toxicity</i>	21
2.2.3 Test rybí bioakumulace	23
2.2.4 Testy toxicity v sedimentu	24
2.2.5 Terestrické testy toxicity	24
2.2.5.1 <i>Žížaly</i>	25
2.2.5.2 <i>Včely a užitečný hmyz</i>	25
2.2.5.3 <i>Testy růstu rostlin</i>	25
2.2.6 Studie mikrokosmu a mesokosmu	26
2.3 Fototoxicita	27
2.3.1 Sluneční záření	27
2.3.2 Mechanismus fotosenzitivity	28
2.3.3 Fototoxicita léčiv	29
2.4 Amoxicilin	32
2.4.1 Skupina penicilinů	32
2.4.2 Amoxicilin	34
2.4.3 Spotřeba antibakteriálních léčiv a amoxicilinu v České republice	35
2.4.3.1 <i>Spotřeba za rok 2005</i>	35
2.4.3.2 <i>Spotřeba za rok 2006</i>	36
2.4.4 Ekotoxikologické testy na amoxicilinu	38
2.5 Testované organismy	40
2.5.1 <i>Artemia salina</i> , L.	40
2.5.2 <i>Brachionus calyciflorus</i>	43
2.5.3 <i>Sinapis alba</i> , L.	46

2.5.4	<i>Tubifex tubifex</i>	48
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	52
3.1	Testované organismy	53
3.2	Chemikálie, pomůcky a zařízení	55
3.2.1	Použité chemické látky	55
3.2.1.1	<i>Použitá léčiva</i>	55
3.2.1.2	<i>Standardy účinné látky</i>	56
3.2.1.3	<i>Ostatní chemikálie</i>	56
3.2.2	Pomůcky a přístroje	57
3.3	Provedení experimentu	60
3.3.1	Příprava a provedení experimentu pomocí <i>Artemia salina</i> , L.	60
3.3.2	Příprava a provedení experimentu pomocí <i>Brachionus calyciflorus</i>	63
3.3.2.1	<i>Kity</i>	63
3.3.2.2	<i>Příprava a provedení experimentu na akutní toxicitu vířníků s pomocí Rotoxkitu F</i>	63
3.3.2.3	<i>Příprava a provedení experimentu na zjištění chronické toxicity vířníků s pomocí Rotoxkitu F Chronic</i>	66
3.3.3	Příprava a provedení experimentu pomocí semen <i>Sinapis alba</i> , L.	68
3.3.4	Příprava a provedení experimentu pomocí <i>Tubifex tubifex</i>	69
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	72
4.1	<i>Artemia salina</i> , L.	73
4.1.1	Augmentin <sup>®</sup> 625 mg – efekt vlivu UVA (365 nm)	73
4.1.2	Augmentin <sup>®</sup> 625 mg - temnostní kontrola	76
4.1.3	Standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)	81
4.1.4	Standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola	73
4.2	<i>Brachionus calyciflorus</i>	86
4.2.1	Rotoxkit F	86
4.2.1.1	Augmentin <sup>®</sup> 625 mg – efekt vlivu UVA (365 nm)	86
4.2.1.2	Augmentin <sup>®</sup> 625 mg - temnostní kontrola	87
4.2.1.3	Standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)	89
4.2.1.4	Standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola	90

4.2.2	Rotoxkit F Chronic	93
4.2.2.1	<i>Augmentin<sup>®</sup> 625 mg – efekt vlivu UVA (365 nm)</i>	93
4.2.2.2	<i>Augmentin<sup>®</sup> 625 mg - temnostní kontrola</i>	94
4.2.2.3	<i>Standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)</i>	95
4.2.2.4	<i>Standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola</i>	96
4.3	<i>Sinapis alba, L.</i>	97
4.3.1	Augmentin <sup>®</sup> 625 mg	97
4.3.2	Standard účinné látky (amoxicilin)	98
4.4	<i>Tubifex tubifex</i>	100
4.4.1	Augmentin <sup>®</sup> 625 mg – efekt vlivu UVA (365 nm)	100
4.4.2	Augmentin <sup>®</sup> 625 mg - temnostní kontrola	102
4.4.3	Ospamox <sup>®</sup> 375 mg/5 ml - efekt vlivu UVA (365 nm)	104
4.4.4	Ospamox <sup>®</sup> 375 mg/5 ml - temnostní kontrola	106
4.4.5	Standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)	108
4.4.6	Standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola	110
4.5	Porovnání výsledků	113
<b>5.</b>	<b>DISKUSE</b>	116
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	130
	Abstrakt	133
	Abstract	134
	Použitá literatura	135

## **1. Úvod**

Léčiva jsou stále běžnější složkou života každého člověka i zvířete, a bohužel se stává, že nevyužitá léčiva končí místo v lékárně jako nebezpečný odpad na skládce společně s komunálním. Zde dochází k vyplavování chemických látek z léčivých přípravků deštěm do podzemních vod.

Léčivé látky se dostávají do životního prostředí i při samotné léčbě pacientů, kdy jsou buď metabolizovány nebo nezměněné vylučovány exkrečními orgány do odpadních vod. I přesto, že tyto jsou před vypuštěním do přírody filtrovány, kanalizační čistírny nejsou schopné léčiva z vody odstranit.

Farmaka se většinou vyskytují v různých vodních kompartmentech v nízkých koncentracích (ng/l – µg/l), avšak může docházet k lokálnímu zvýšení koncentrací v místě např. menších nemocničních kanalizačních čistíren. Sloučeniny rozpustné ve vodě pak mohou vzhledem ke své pohyblivosti kontaminovat podzemní vody, zatímco lipofilní se budou spíše akumulovat v sedimentu.

Stejně tak jako humánní léčiva, jsou i veterinární používána ve velkém objemu, přičemž při léčení jsou zvířaty exkretována. Pak se např. kravskou mrvou metabolizovaná či intaktní léčiva dostávají do agrikulturních půd a prostřednictvím zemědělských rostlin se dostávají do potravy.

Přesný ekotoxikologický efekt léčivých látek včetně jejich metabolitů na různé hladiny biologické hierarchie, od bakterií kompletní biosférou konče, není dobře znám. Jsou to biologicky aktivní sloučeniny, které mohou interferovat se specifickými biologickými systémy (např. enzymy) nebo v závislosti na tom, jak se chovají v lidském organismu.

Zvláštním případem léčiv jsou antibakteriální léčiva. I když je v posledních několika letech obecný trend snižovat jejich nadužívání, jsou stále nadměrně a zbytečně předepisována. Nejen, že se tím zvyšuje rezistence patogenních bakterií, přičemž tento efekt je nevratný, ale dochází i k ohrožení necílových organismů. Zatímco toxicita antibiotik na patogenní bakterie a na savce použité při klinickém zkoušení je známa, je dostupných jen málo dat o ekotoxikologii těchto léčiv, přičemž např. bezobratlí tvoří rozsáhlou složku fauny ve vodním ekosystému a hrají důležitou roli v potravním řetězci.



## 1.1. Cíl práce

Na základě databáze AISLP (Automatizovaný informační systém databáze léčivých přípravků) jsme zvolili amoxicilin za testované antibiotikum. Takto získaná data ovšem vykazují, podle podkladů státních institucí a dalších organizací, jen prodej léčiva a nevyjadřují jeho skutečnou spotřebu lidmi nebo zvířaty.

Amoxicilin, polosyntetický aminopenicilin, je stále v popředí spotřeby všech antibakteriálních chemoterapeutik pro své široké spektrum účinku, které zahrnuje jak mnoha gram-pozitivní mikroorganismy, gram-negativní koky a některé další gram-negativní organismy. Vzhledem k tomu, že je biotransformován jen z 10 % játry a z 60 – 75 % eliminován ledvinami v nezměněné podobě, je velká pravděpodobnost, že se močí jím léčených osob či zvířat dostane do povrchových vod. Léčivo se ovšem může dostávat do vody i vyluhováním z různých lékových forem ze skládek komunálního odpadu. Zde může spolupůsobit se slunečním zářením na mnoho necílových organismů a tím je různě ovlivňovat.

Cílem práce bylo zjistit možný vliv amoxicilinu ve formě léčivých přípravků (Augmentin<sup>®</sup> 625 mg a Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml) na životní prostředí porovnáním s analytickým standardem pomocí různých ekotoxikologických testů. Ty jsme vybírali takové, které se dají použít v běžném laboratorním měřítku, tj. bez zvláštních nároků na vybavení laboratoře a pomocné chemikálie, a které jsou hodnověrné, citlivé a snadno reprodukovatelné.

Hodnotili jsme akutní toxicitu na mořském korýši *Artemia salina*.

Pomocí mikrobiotestu Rotoxkitu F a Rotoxkitu F Chronic jsme studovali akutní a chronickou toxicitu vířníka *Brachionus calyciflorus*, patřícího do skupiny prvoústých, důležitých součástí planktonu.

Na semenech vyšší dvouděložné rostliny, hořčici bílé *Sinapis alba*, jsme zjišťovali inhibici růstu kořene.

Akutní toxicitu jsme též studovali i na kroužkovci, nítěnce obecné *Tubifex tubifex*, pomocí testu vyvinutého katedrou Farmaceutické botaniky a ekologie.

U každého z exponovaných živočichů jsme zjišťovali i vliv ultrafialového záření při vlnové délce 365 nm.

U živočichů jsme zjišťovali  $EC_{50}$ , tj. dávku, která způsobí u 50 % populace toxický efekt, a u *Sinapis alba* pak inhibici růstu kořene v procentech.

## **2. Teoretická část**

## **2.1. Ekotoxikologie**

Ekotoxikologie je poměrně mladá mezioborová vědní disciplína na pomezí chemie životního prostředí, toxikologie, ekologie a biologie, o které, jako o samostatném vědním oboru, se hovoří teprve od konce 60. let 20. století. (Kočí, V.; 2006)

Ekotoxikologie se zabývá studiem toxického působení látek lidského či přírodního původu na živé organismy, jejich populace a společenstva. Kromě sledování účinků látek je předmětem zájmu ekotoxikologie i pohyb toxikantů v životním prostředí. (sweb.cz/ekotoxikologie/)

Ekotoxikologie studuje nepříznivé vlivy chemikálií na životní prostředí a na ekologické systémy. Tyto efekty jsou jak letální (mortalitní) tak subletální (např. efekty na růst a vývoj) a mohou být vyjádřeny kvalitativně i kvantitativně. Studie nových a již existujících sloučenin jsou ve většině případů uskutečňované standardizovanými laboratorními testy, které musí být reprodukovatelné, citlivé a hodnověrné. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Při akutní toxicitě se jedovatý účinek projevuje velmi rychle, řádově po několika hodinách i minutách. Při chronické toxicitě se účinek projeví po týdnech, měsících. Zatímco při akutní toxicitě je ovlivněn přímo jí vystavený organismus, u chronické toxicity se její projevy zjišťují až na dalších vývojových generacích (problémy s plodností, degenerace na potomcích). (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Ekotoxikologické studie by měly být ekologicky relevantní, ale vzhledem k velkému množství organismů přítomných v různých světových ekosystémech je toto provedení nerealistické. Regulační studie se proto zaměřují na druhy, které umožňují určit riziko pro životní prostředí.

Regulační ekotoxikologické studie vedly k definovaným metodickým postupům publikovaným EU, OECD, US EPA, japonským Ministerstvem hospodářství, obchodu a průmyslu (METI) a Ministerstvem zemědělství, lesnictví a rybaření (MAFF), ačkoli primární byly OECD metody. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

V jednotlivých zemích světa byly standardizovány různé metodiky umožňující porovnání výsledků mezi laboratořemi. Mezi nejrozšířenější patří metodiky ISO a OECD. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Testování se zaměřuje především na vodní prostředí a na různé úrovně potravního řetězce. Voda je totiž primární cestou odstraňování syntetických chemikálií buď potoky, nebo potrubími vedoucími od zdrojů znečištění. Většina regulačních plánů se ale zaměřuje více na sladkovodní prostředí, i když mořské prostředí je stejně důležité. Využívají se stejné metody testování, však namísto sladkovodních organismů se užívají mořští. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Testy na organismech vodního prostředí jsou vhodné pro hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů na skládky, havárií průniku odpadních vod do povrchových či podzemních zdrojů. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Ke dni 18. 12. 2006 bylo schváleno nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 REACH (Registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek). Nařízení nabylo účinnosti dne 1. 6. 2007. ([www.ekonox.cz](http://www.ekonox.cz))

Nový systém kontroly chemikálií REACH zajistí, aby se nejpozději od roku 2020 používaly pouze chemické látky se známými vlastnostmi a to způsobem, který nepoškozuje životní prostředí a zdraví člověka. Registrace chemických látek podle REACH se bude vztahovat na chemické látky vyráběné v zemích EU a na chemické látky do EU dovážené jako takové nebo jako součást přípravků či výrobků v množství rovném nebo vyšším než 1000 kg ročně. Registraci podléhají chemické látky klasifikované jako nebezpečné a také nebezpečné chemické látky, které se uvolňují z výrobku při jeho řádném používání v množství 1000 kg ročně a vyšším celkově za typ výrobku.

Povinnost registrace podle REACH se nevztahuje na humánní a veterinární léčiva, přísady do potravin a krmiv, a látky používané k výživě zvířat. Z povinnosti registrace jsou vyjmuty polymery a látky, které jsou považovány za nezávažné a látky, které se vyskytují v přírodě. ([www.reach.cz](http://www.reach.cz))

## **2.2. Ekotoxikologické biotesty**

Podstatou ekotoxikologické práce jsou testy toxicity, které slouží k zjištění či odhadu možného toxického vlivu testovaných látek na živé organizmy. Ekotoxikologické testy jsou nespecifické, to znamená, že zachycují celkové toxické účinky všech látek přítomných v testovaných vzorcích bez nutné bližší znalosti jejich složení či chemické struktury. ([sweb.cz/ekotoxikologie/](http://sweb.cz/ekotoxikologie/))

Pro hodnocení ekotoxikologických vlastností látek jsou používány biologické testy toxicity. Význam biologických testů spočívá v postižení souhrnu účinků všech přítomných komponent v testovaném roztoku na testovaný materiál (organismus, kultura, tkáň, buňka). Umožňují rychlé a dostatečné zhodnocení odpadů, na jejichž základě lze případně odhadnout negativní účinek těchto látek. Testy podávají i informace o biologické aktivitě a schopnosti toxických látek procházet biomembránami, jsou založené na fyziologických pochodech, biochemických změnách, fotosyntéze a dýchání. Testy na biologickém materiálu mají za hlavní cíl stanovení hraniční koncentrace, ve kterých je možný život vybraných testovacích organismů. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Při testování se nejprve musí zjistit, zda a jak se daná látka v prostředí degraduje a zda působí toxicky na mikroorganismy, které ji případně rozkládají. Dalším stupněm je zjištění případného toxického efektu na různé trofické stupně v prostředí. Nejdříve se zjišťuje efekt na primární producenty (řasy), dále na primární konzumenty (bezobratlí) a nakonec na sekundární konzumenty (ryby). Pokud je látka toxická pro řasy a pro další články potravního řetězce již není, mohou se ukázat změny na životním prostředí tím, že je ohrožena potrava vyšších článků. Subletální efekty mohou vést k akumulaci chemikálie v určitém jedinci a ke zvyšování koncentrace ve vyšších člancích řetězce.

Výběr testovacích druhů je řízen nejen citlivostí k chemikáliím, ale také snadností jejich kultivace, dostupností, schopností snášet laboratorní podmínky a snadností určit toxikologický endpoint.

Pro tyto testy je důležité, že testované organismy nejsou přímo vystaveny testované látce, jako je to u savčích testů, ale jsou jí ovlivňovány přes prostředí. Proto se

při kvantitativním stanovení toxicity používá letální koncentrace (LC) místo letální dávky (LD). (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Existuje velké množství biologických testů, které mohou být různým způsobem klasifikovány. Nejběžnější je klasifikace podle délky kontaktu bioindikátoru s testovaným toxikantem, podle které jsou testy členěny na akutní, subchronické a chronické. Je ovšem třeba zdůraznit, že toxicita určité látky může být pro různé organismy různá. Proto je nutné postupovat velmi opatrně při zobecňování informací získaných na jednotlivých testovacích bioindikátorech zvláště ve vztahu k člověku. Pro zvýšení objektivity se často pro testování používá nejen jeden druh organismu, ale soubor několika biologických druhů různé složitosti a trofické úrovně. (Kafka, Z. a kol.; 1999)

Testy toxicity se provádějí na třech úrovních:

1. na úrovni buněk a tkání (používají se pro teoretické objasnění poznatků získaných při pokusech na organismech, výhodou je jejich dobrá reprodukovatelnost a naopak nevýhodou je značná odlišnost výsledků „in-vitro” od výsledků obdržených „in-vivo”);
2. na úrovni jedinců či organismů (můžeme se setkat s potížemi spojenými s reprodukovatelností);
3. na úrovni společenstev, biocenóz (sleduje se toxický účinek v přírodě či na modelu, nevýhodou je fakt, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně, různé reakce na určitý druh, narušení potravních řetězců).

Inovační trendy v ekotoxikologii lze charakterizovat třemi generacemi testů toxicity.

První generace testů je představována klasickými, standardními a konvenčními metodikami, které jsou založené na akutních testech toxicity na v laboratoři chovaných organismech a udržovaných kulturách, příkladem jsou ryby druhů *Poecilia reticulata* (živorodka duhová) a *Brachydanio rerio* (danio pruhovaný) korýši *Daphnia magna*, chlorokokální řasy druhů *Scenedesmus quadricauda* a *Scenedesmus subspicatus*, semena klíčících kulturních rostlin *Sinapis alba* (hořčice bílá) a *Lactuca sativa* (salát setý).

Druhá generace testů toxicity se začíná v současné době stále více používat a je představována alternativními biotesty, známé pod názvem mikrobiotesty. Tyto testy využívají klidová stádia testovaných organismů. V případě testů na bezobratlých (perloočky, vířníci) se používají cysty (vířníci) a ehipia (dafnie), testů na rybách se aplikují tkáňové kultury a jikry, v testech na bakteriích se používají jejich lyofilizované kultury, v řasových testech imobilizované a hluboce zamražené řasové kultury. Nověji je původní test na klíčících rostlinách nahrazován testem na kalusu (tkáňová kultura nediferenciovaných buněk).

Zcela na počáteční úrovni je třetí generace testů toxicity, která využívá biosenzory a biosondy a je založena na fluorescenčním značení toxické látky. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Ekotoxicitu vykazují takové odpady, jejichž vodný výluh negativně ovlivní alespoň jeden druh testovacích organismů, přičemž doba kontaktu výluhu s bioindikátorem je pevně stanovena. Jako bioindikátory se používají ryby, řasy, dafnie a semena hořčice bílé. (Kafka, Z. a kol.; 1999)

### **2.2.1. Testování bakteriální toxicity**

*Testování inhibice respirace aktivovaného kalu* je nejběžnější formou testu bakteriální toxicity dle OECD Metodického postupu č. 209. V podstatě se skládá z nádoby obsahující aktivovaný splaškový kal a testovaný materiál, které jsou provzdušňovány po dobu tří hodin. Syntetický kal, skládající se z proteinů, močoviny, masového extraktu a roztoku pufry, je přidán k substrátu pro umožnění dýchání mikroorganismů a v další nádobě je pozitivní kontrola (3,5-dichlorfenol), která běží současně s pokusem. Rychlost dýchání je určována každou kontrolou a na konci expozice. Úrovně dýchání jsou srovnány a vypočte se procentuální inhibice. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

*Microtox test* využívá ke zjišťování toxicity pokles produkce světelného bioluminiscenčního toku mořských světélkujících bakterií *Photobacterium phosphoreum* vlivem xenobiotik přítomných v hodnoceném vzorku. Tyto bakterie využívají přibližně 10 % metabolické energie při přeměně energie chemické na



viditelné světlo pomocí elektronového transportního systému. Uvedená přeměna je spojena s buněčným dýcháním. Změna buněčného metabolismu nebo porušení buněčné struktury ovlivňuje dýchání a tedy i intenzitu bioluminiscence. Biotest Microtox umožňuje upravit experiment pro zjišťování toxicity organických látek s omezenou rozpustností ve vodě.

**Mutatox.** Specifickou modifikací Microtox testu je biotest zvaný Mutatox, který se využívá pro hodnocení genotoxicity (mutagenity) a pro rychlý screening kancerogenních látek zejména v potravě a v lécích. Mutatox je typickým příkladem aplikace bioluminiscenčních bakterií pro měření chronické toxicity. (Kafka, Z. a kol.; 1999)

### **2.2.2. Akvatické testy toxicity**

Tyto testy jsou vedeny na základě standardních doporučení EU, OECD nebo US EPA Kanceláře pro ochranu, pesticidy a jedovaté materiály (OPPTS). Většina studií je uskutečněna s použitím sladkovodních druhů, ale testy mohou být snadno přizpůsobeny mořským. Dodání substance do systému je zásadní pro stanovení toxicity. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Biotesty pro vodné různě kontaminované vzorky nebo jejich výluhy jsou navrhovány tak, aby indikátorovými organismy byly typické druhy zastupující nejvýznamnější složky ekosystémů povrchových vod. Bioindikátory mohou reagovat na přítomnost toxikantů např. určitou změnou některé fyziologické funkce, změnou pohyblivosti, růstu nebo reprodukce. V krajním případě může být testovací organismus toxikantem usmrcen. (Kafka, Z. a kol.; 1999)

Když je to možné, vyhýbá se testování na obratlovcích, a pokud už je toto testování pokládáno za nutné, mělo by být minimalizováno. Dává se přednost bezobratlým. Před testováním ryb musí být však vyřešeny jakékoli etické problémy.

Pro akutní testy toxicity se užívají hodnoty  $LC_{50}$  ( $LC_{50}$  je letální koncentrace, která ukazuje 50% odpověď v populaci) a  $EC_{50}$  ( $EC_{50}$  je efektivní koncentrace, která ukazuje 50% odpověď v populaci) a stejně tak NOEC (koncentrace, při níž nebyly pozorovány žádné rozdíly od kontrolního vzorku).

Přesné stanovení koncentrace testované látky v exponovaných nádobách je pro určení toxicity kritické. Mnoho látek je stabilních ve vodě a nevykazují žádné problémy v určení efektivních koncentrací, přesto jich je mnoho, se kterými problémy jsou. Mohou se hydrolyzovat, oxidovat, fotodegradovat nebo se biologicky rozkládat v testovacích podmínkách a proto je důležité najít vhodnou analytickou metodu k měření koncentrace látky a pokud je to možné, tak i degradačních produktů.

Na základě získaných hodnot  $LC_{50}$  jednotlivých látek jsou stanoveny 4 úrovně nebezpečí pro vodní prostředí: 1. koncentrace do 1 mg/l je vysoce toxická pro vodní život; 2. koncentrace od 1 do 10 mg/l je toxická pro vodní život; 3. koncentrace od 10 do 100 mg/l je mírně toxická; 4. koncentrace nad 100 mg/l je relativně netoxická.

Testování se uskutečňuje až do maximální koncentrace 100 mg/l nebo do limitu rozpustnosti ve vodě pro slabě rozpustné látky. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

#### 2.2.2.1. Akutní testy toxicity

**Řasové testy toxicity** dovolují měření akutní toxicity, ale mohou být použity i jako indikátory chronické toxicity. K testům mohou být dle OECD užity jak sladkovodní druhy (*Scenedesmus subcapitatus* nebo *Pseudokirchneriella subcapitata*) tak i mořské druhy (*Skeletonema costatum*) a mohou trvat 72 nebo 96 hodin. K poskytnutí doplňujících informací mohou být použity i druhy z dalších taxonomických skupin, jako je rozsívka *Navicula*. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus quadricauda*, *S. subspitatus*, *Selenastrum capricornutum* je standardizována metodikou ČSN EN ISO 28692.

Princip testu spočívá ve stanovení toxického účinku vodou vyluhovatelné látky na inhibici růstu a rozmnožování chlorokokální řasy v jednotlivých koncentracích sledované látky ve srovnání s kontrolami v čistém živném roztoku. Při testu je vhodné zaznamenávat i odchylky od normálního tvaru buněk. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Testovaná chemikálie se smísí s řasovou kulturou v definovaném médiu o počáteční hustotě asi  $1 \cdot 10^4$  buněk na mililitr. Na konci testu buněčná hustota narůstá dle délky testu až na  $1 \cdot 10^8$  buněk na mililitr. Pro splnění validačních kritérií musí paralelně probíhat kontrola s pH, které by nemělo kolísat o více jak 1,5 jednotku po

celou dobu testu. Vzorky jsou vytahovány každodenně a hustota je určována přímým počítáním buněk buď mikroskopem a počítacími komůrkami nebo elektronickým počítadlem částic. Testované nádoby se inkubují v 24°C pod konstantním zářením asi 7 000 lux a míchají se. Na konci exponované doby se buněčná hustota využije k přepočítání na hodnoty EC a NOEC. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

**Testy akutní toxicity na bezobratlých** se standardně provádějí na sladkovodní *Daphnia magna*. Metodika používaná při testech na korýších je ČSN EN ISO 6341, kterou se zjišťuje inhibice pohyblivosti perlooček. (Říhová Ambrožová, J.; 2007) Metoda užívá živočichy v nejcitlivějším životním stádiu, tj. v prvním růstovém stupni larvy, což je méně než 24 hodin. Organismy jsou získány z partenogenetických laboratorních chovů s kvalitní potravou z řas. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Typicky se test provádí s použitím 250ml nádob. (Knight, D. J. a kol.; 2003) Požadované koncentrace se připraví ředěním testované látky ředící vodou. Před testem je vhodné vytemperovat vzorky na laboratorní teplotu. Asi 2 hodiny před testem se doporučuje odlovit mladé dafnie do nádoby s ředící vodou a nakrmit je kulturou chlorokokální řasy přidané v podobě několika kapek k roztoku. Do každé koncentrace se nasazuje po 10 až 60 kusech dafnií (požadavek 5 ml na jedince), stejným způsobem se nasadí i kontrola. Správnost přípravy pracovních roztoků a použití životaschopných jedinců limituje hranice maximálně 10 % mortality či imobilizace (tj. neschopnost plavat během 15 sekund po zatřesení nádobou) v kontrolním roztoku. Test probíhá po dobu 48 hodin, při teplotě 20 °C ± 2 °C, bez aerace, bez osvětlení a bez krmení perlooček. Během testu se zaznamenává chování (imobilizace) a úhyn perlooček za 24 hodin a 48 hodin. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Rozpuštěný kyslík, teplota a pH jsou monitorovány na startu a na konci testu. Pro validaci testu je nutné, aby bylo na konci testování v nádobě více jak 3 mg kyslíku na litr, aby dafnie nebyly uvězněny na vodním povrchu a pH se měnilo o více jak 1 jednotku.

Pro získání EC<sub>50</sub> a NOEC se používá 9 testovaných koncentrací, kontrola a pokud je nutné i kontrola s rozpouštědlem s tím, že se vše duplikuje. Tím, že je organismus relativně malý, není možné přesné stanovení smrti, protože může být stále naživu neschopný plavat. Pro její přesné určení je nutné mikroskopické stanovení tlukotu srdce, což je však pro tento druh testu nadměrné. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

V současné době jsou chovy perlooček nahrazovány tzv. řízenou produkcí z jejich klidových stádií (tzv. ehipií) při tzv. alternativních testech. V takovém případě probíhá líhnutí korýšů od 24 do 72 hodin od počátku inkubace. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Jako mořský ekvivalent se pro test užívá *Acartia tonsa*. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

**Rybí testy akutní toxicity** užívají různé druhy ryb, jako jsou např. danio pruhované (*Brachydanio rerio*), střevle *Pimephales promelas*, kapr obecný (*Cyprinus carpio*), medaka japonská (*Oryzias latipes*), slunečnice velkoploutvá (*Lepomis macrochirus*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), živorodka duhová (*Poecilia reticulata*), jelec jesen (*Leuciscus idus*), platýs *Scophthalmus maximus* anebo *Cyprinodon variegatus*. Požadavky na teplotu vody a rozměr ryb jsou odlišné pro metody OECD a US OPPTS. Další velké rozdíly mezi těmito metodami jsou v počtu užitých jedinců. OECD/EU požaduje 7 až 10 ryb v testovací skupině zatímco US OPPTS 20 ryb ve skupině (dvě opakování po 10). (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Cílem testu je stanovení toxicity vodou vyluhovatelných látek z odpadu na ryby. Při testech je potřeba pracovat v souladu se zněním zákona č. 246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání a dále vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 207/2004 Sb. O ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Testy jsou prováděny v laboratoři v potřebné teplotě pro určitý druh po dobu 96 hodin s 16 hodinami světla. Nejčastěji se používají dvacetilitrová akvária s tím, že mohou být i větší. Testovaným prostředím může být buď destilovaná voda, nebo častěji voda z vodovodu, která neobsahuje škodlivé koncentrace chloridů, těžkých kovů, pesticidů nebo dalších látek. V protokolu by měla být detailně uvedena data o kvalitě vody. Denně je monitorován rozpuštěný kyslík, teplota a pH. Akvária musí být stále provzdušňována s výjimkou testů s těkavými látkami, kdy jsou použity zapečetěné nádoby. Ryby jsou aklimatizovány 12 dní na určitou teplotu a jsou krmeny komerčním rybím krmivem, což je přerušeno 24 hodin před začátkem testu a během expozice již dále příkrmovány nejsou. Pro získání hodnoty  $LC_{50}$  v limitním testu je třeba 5 koncentrací ve dvou paralelách, kontrola a pokud je to nutné, tak i kontrola s rozpouštědlem. Obvykle je test veden pod polostatickými (denně obnovovanými) podmínkami, ale pro nestabilní látky je použita průtočná metoda. Statické podmínky mohou být užity, pokud jsou látky stabilní ve vodě po dobu 96 hodin a pokud dusíkové produkty z rybích exkrementů neruší test. Data se získávají po 24, 48, 72 a 96 hodinách

expozice. Mortalita v kontrolách nesmí překročit 10 %, koncentrace rozpuštěného kyslíku musí být větší než 60 % a pH nesmí kolísat o více jak jednu jednotku. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Výchozí metodikou v České republice pro test akutní toxicity na akvariijních rybách druhů *Poecilia reticulata* a *Brachydanio rerio* je soubor ISO norem: ČSN EN ISO 7346-1 (Statická metoda), ČSN EN ISO 7346-2 (Obnovovací metoda) a ČSN EN ISO 7346-3 (Průtočná metoda). Pro tento test platí, že probíhá při teplotě  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , bez aerace a bez krmení organismů. Zředovací vodou je pracovní roztok solí použitý v požadovaném objemu 100 ml na jednoho jedince. Počet testovaných organismů v jedné koncentraci je 3 až 10 kusů (v jedné sérii testu je vhodné nasadit vždy stejný počet). Test probíhá za uvedených standardizovaných podmínek po dobu 48 hodin, dle metodik ISO se prodlužuje až na 96 hodin. (Řihová Ambrožová, J.; 2007)

OECD publikovalo test, který používá citlivější životní stupně ryb, jako jsou embrya a rybí potěr, pro získání jemnějších efektů zátěže životního prostředí. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

#### **2.2.2.2. Chronické testy toxicity**

V případě nutnosti získání přesnějšího určení toxicity a identifikování dlouhodobého rizika pro životní prostředí, se používají chronické testy. Užívají se nižší koncentrace látek než u akutních testů a zkoumají se komplexněji konečné výsledky, které mohou zahrnovat i reprodukční efekty. Trvání testů je delší a vyžaduje se krmení organismů. Testované koncentrace jsou často určeny na základě výsledků akutní toxicity.

**Testy na vodních rostlinách.** Standardní růstové testy poskytují měřítko chronické toxicity již od doby, kdy se začnou dělit buňky. Dodatečné výsledky toxicity pro vodní rostliny mohou být určeny studováním efektu testované chemikálie na vyšších rostlinách, jako je *Lemna* (okřehek). Růst testovaného organismu je určen přibýváním vějířovité struktury (nebo listů plovoucích rostlin). Test se provádí při teplotě vody  $24\text{ °C}$  za konstantního osvětlení (přibližně 7000 lux) v trvání 7-14 dní. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Rostliny okřehku menšího se nechají růst v různých koncentracích testované látky rozpuštěné ve Steinbergově živném roztoku. Současně se nasadí testovací rostliny do kontrolního živného roztoku bez testované látky. V intervalu 24 hodin se kontroluje a zaznamenává stav rostlin a počet lístků. Cílem testu je kvantifikovat účinky látky na vegetativní růst okřehku posouzením počtu listů - rychlosti růstu a alespoň jedné ze tří volitelných charakteristik: velikosti listové plochy, hmotnosti sušiny nebo obsahu chlorofylu. Délka expozice je 7 dní. (Jirků, J. a kol.; 2003)

**Reprodukční testy na *Daphnia magna*** vycházejí z výsledků akutních testů. Reprodukční testy zkoumají efekty na růst již od prvního vývojového stádia *Daphnia* až do stupně dospělosti a následné efekty na jejich rozmnožování. (Knight, D. J. a kol.; 2003) Mladé samice, staré maximálně 24 hodin, se exponují testovaným vzorkům v koncentrační řadě, po dobu 21 dní. (OECD; 1998) V testu se používá pět koncentrací získaných z akutního testu na základě hodnot  $EC_{50}$  a kontrola, a pokud je to nutné tak i kontrola s rozpouštědlem. *Daphnia* zahajuje reprodukci okolo 7. dne života. Každá testovaná koncentrace má 10 nádob, každá po jedné dafnii. Jejich médium je nahrazováno každé dva nebo tři dny a živočichové jsou krmeni koncentrovanou řasovou suspenzí tak, aby byl poměr 0,1 - 0,2 mg uhlíku na dafnii a den. Expoziční podmínky jsou popsány u akutního testu. Mláďata jsou denně vytahována a počítána. NOEC se stanovuje s pomocí velikosti a stavu mateřských dafnií a jejich mláďat. Analýzy čerstvě připraveného a starého média ručí za správné stanovení koncentrace, již jsou živočichové vystavováni. (Knight, D. J. a kol.; 2003) Na konci testu je stanoven celkový počet narozených potomků, vztažený na jednoho žijícího rodiče. (OECD; 1998)

**Testování růstu ryb** vychází z výsledků testů na akutní toxicitu. Studie je navrhována na růst pstruhů během 28 dní. Testovací koncentrace jsou takové, aby nezpůsobily smrt a aby bylo možné monitorovat chronické efekty. Podmínky expozice jsou stejné jako u akutních testů s tím rozdílem, že ryby jsou drženy ve skupinkách po 16 zvířatech a jsou denně krmeny komerčními krmivy v dávce, která odpovídá 4 % tělesné hmotnosti. Krmení je obvykle rozděleno do dvou stejných porcí s tím, že další se může do systému přidat pouze v případě, že předchozí krmivo bylo zkonsumováno. Pokud je to možné, tak se používají průtočné testovací podmínky a to jak z důvodu udržení zdraví ryb, tak k udržení testovací koncentrace. Nesnědené krmivo a rybí exkrementy jsou odstraňovány dvakrát denně, protože adsorpce testovaného materiálu na organické zbytky ho může redukovat na minimum. Ryby jsou zváženy a jejich délka

je zaznamenána v den 0. 14. den a na konci testu se opět určuje délka a váha ryb. Regresní analýza je užívána pro zjištění  $EC_{20}$  a hodnota NOEC je určena statistickou analýzou (analýza odchylek). Běžná analýza testovacího média zabezpečuje přesné zjištění koncentrace látky.

*Testy na ranných životních stádiích ryb* jsou alternativou k růstovým testům. V těchto testech jsou čerstvě oplozená vajíčka v průtočných podmínkách vystavena testované látce, která ovšem není v dané koncentraci pro ně smrtící. Vývoj (přežití a růst) vajíček a potěru se sleduje až 35 dní po líhni v závislosti na druhu. Zpravidla se v tomto testu užívají střevle, protože se snadněji za laboratorních podmínek chovají a dávají během roku dobrou zásobu čerstvě oplozených vajíček. Vylíhlý potěr pro zajištění maximálního růstu potřebuje živé krmení (např. prvoky, trepky nebo žábronožky). Test má dvě paralelní nádoby, z nichž každá má po 30 vajíčkách. Ostatní testovací podmínky jsou stejné jako u testu akutní toxicity. Na konci testu se vyhodnotí váha a délka rybek a jejich počet a statistickou analýzou jsou určeny hodnoty LOEC a NOEC. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

### **2.2.3. Test rybí bioakumulace**

Testovaný materiál s vysokým rozdělovacím koeficientem v systému  $n$ -oktanol – voda (tj.  $\log P > 3$ ), který se ve vodě vyskytuje ve velkém množství, se může hromadit v potravě a tím i ve vodních živočiších.

Test rybí bioakumulace může být veden na různých druzích ryb v těch koncentracích, které odpovídají setině a tisícině hodnoty  $LC_{50}$  získané v testu akutní toxicity. Nejběžněji užívanými druhy ryb v tomto testu je kapr obecný a pstruh duhový. Studie probíhá od 28 dní až do 8 týdnů, ale může být ukončena v bodu, kdy tři po sobě následující měření ukáží, že sloučenina je v rybí tkáni ve stálé koncentraci. Test probíhá v průtočných podmínkách. Ryby jsou krmeny denně v dávce, která odpovídá 2 % jejich hmotnosti. Ryby se pro test používají delší než v testech akutní toxicity (pstruh  $8 \pm 4$  cm a kapr  $5 \pm 3$  cm) a voda je udržována na optimální teplotě pro daný druh. Běžně se sleduje koncentrace látky v médiu a živočichové jsou pravidelně utráceni pro zjištění množství v celém organismu nebo v jeho jednotlivých částech (hlava, vnitřní orgány a svalstvo). Tato data se užívají ke zjištění faktoru biokoncentrace (BCF), který je

konečným výsledkem celého testu. Hodnoty BCF větší než 500 dávají důvody ke starostem a hodnoty větší než 1 000 mohou ukazovat na to, že testovaný materiál se pravděpodobně hromadí ve vodních organismech. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

#### **2.2.4. Testy toxicity v sedimentu**

U substancí vyskytujících se ve vodě ve vysokém množství, a které se absorbují do organického základu (mají vysoký absorpční koeficient), se sleduje jejich vliv na organismy v sedimentu. OECD publikovala metody využívající druhy pakomárů (*Chironomus*), ale mohou být užity i jiné druhy jako je žížalice pestrá (*Lumbriculus variegatus*).

Je užitečné získat jednotlivé výsledky testů od více jak jednoho taxonu a proto je testování *Lumbriculus* doprovázeno dalším testováním na pakomárech. *Lumbriculus* se primárně živí sedimentem, zatímco *Chironomus* roztokem ve štěrbinách sedimentu.

Oba testy zahrnují využití umělého sedimentu s testovaným materiálem v definovaném médiu. Testované organismy se přidají do systému a v případě *Chironomus* end pointem je vznik dospělých much, zatímco u *Lumbriculus* je to přežití a reprodukce (tj. zvýšení počtu organismů).

#### **2.2.5. Terestrické testy toxicity**

Sloučeniny, které se absorbují do organického základu, mohou mít vliv přes odpadní vody na půdní prostředí. Běžně se splašky dále dostávají do půdy ze skládky odpadů nebo aplikací hnojiv na ornici. Získání dat dokládajících toxicitu na půdní organismy je nutné, pokud se chemikálie vypouští do životního prostředí ve vysokém objemu. (Knight, D. J. a kol.; 2003)



### 2.2.5.1. Žížaly

Je zde mnoho metod testování toxicity chemikálií na žížalách, včetně místní aplikace, násilného krmení a zkoušky ponorem. OECD doporučuje test v umělé půdě a jako nepovinný test toxicity papírový kontaktní test. (OECD; 1984)

Studie na dešťovkách se provádí v umělé půdě, která umožňuje jejich rozmnožování. Jako testovací druh je upřednostňována kalifornská dešťovka *Eisenia foetida*, která sice není původním druhem žijícím v půdě, ale normálně se vyskytuje v hnoji, má kratší vývojový cyklus než původní druhy a lépe se chová v laboratorních podmínkách. Testovaný materiál se promíchá s umělou půdou a dešťovky se položí na povrch. Test probíhá 14 dní při 21°C za konstantního osvětlení, které zajišťuje, že zvířata zůstanou v půdě. Dešťovky nejsou během expozice krmeny a na konci studie se u 40 přeživších živočichů zaznamená změna délky (4 opakování po 10 dešťovkách na testovanou koncentraci). (Knight, D. J. a kol.; 2003)

### 2.2.5.2. Včely a užitečný hmyz

Pro průmyslové chemikálie včetně léků je velmi nepravděpodobné, že dojde k přímé expozici těchto organismů. Avšak u pesticidů je toto testování povinné. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

### 2.2.5.3. Testy růstu rostlin

Když jsou splašky aplikovány na ornici jako hnojiva, tak se musí studovat jejich efekt na růst rostlin. Test publikovaný OECD užívá tři rostlinné druhy: dva jednoděložné a jeden dvouděložný. Testovaná chemikálie je smíchána s půdou o definovaném složení a semena rostou po známou časovou periodu za podmínek vhodných pro určitý druh. Koncem testu je vznik semenáčků a váha kořínku. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

Příkladem takového testu je krátkodobý test klíčivosti *Sinapis alba*. Test byl vyvinut k testování účinku odpadních vod na závlahy. Při této zkoušce se využívá citlivosti klíčících semen hořčice bílé *Sinapis alba* v počátečních stádiích vývoje rostliny na jedovaté látky. Test probíhá po dobu 72 hodin, při teplotě 20 °C ± 2 °C, bez

osvětlení. Princip spočívá v kultivaci semen za standardních podmínek v různých koncentracích toxické látky v Petriho miskách na podložce nasycené pracovním roztokem. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

#### **2.2.6. Studie mikrokosmu a mesokosmu**

Tyto testy se obvykle vyžadují u agrochemikálií. V těchto testech jsou přírodní podmínky napodobeny buď ohraničením a částečným uzavřením venkovní jednotky, která blízce simuluje přírodní prostředí (testy v mesokosmu) nebo malé venkovní nádrže či malý laboratorní systém s více druhy (studie mikrokosmu). Velkou péčí vyžaduje navrhnutí tohoto testu a výběr testovaných druhů a tato studie má dlouhého trvání. (Knight, D. J. a kol.; 2003)

## **2.3. Fototoxicita**

### **2.3.1. Sluneční záření**

Sluneční záření poskytuje energii naší biosféře, atmosféře, pevnině i oceánům. Fotochemické reakce hrají významnou roli v životním prostředí. Světlo se zapojuje do velké části reakcí v atmosféře, vodě, půdě i živých organismech. Reaktivní fragmenty, které se podílejí na vzniku a hnací síle atmosférické chemie, vznikají tak, že molekuly nacházející se v atmosféře jsou disociovány příchozími fotony. (Boule, P.; 1999)

Sluneční záření lze rozdělit na dvě části, a to na sluneční záření přímé a rozptýlené (difúzní). Přímé sluneční záření přichází do oka pozorovatele ze Slunce a vzhledem k velké vzdálenosti Země od Slunce tvoří svazek prakticky rovnoběžných paprsků. Rozptýlené sluneční záření vzniká následkem rozptylu přímých slunečních paprsků na molekulách plyných složek vzduchu, na vodních kapičkách, ledových krystalcích a na nejrůznějších aerosolových částicích vyskytujících se v zemském ovzduší. (Bednář, J.; 1989)

Sluneční záření je elektromagnetické vlnění o spektru vlnových délek, které se obvykle dělí na tři hlavní části, a podle toho rozlišujeme:

4. Ultrafialové sluneční záření s vlnovými délkami menšími než 390 nm, které před vstupem do zemské atmosféry tvoří asi 7 % energie celkového elektromagnetického slunečního záření a jež je ze značné části absorbováno atmosférickým ozónem ve stratosféře.
5. Viditelné sluneční záření s vlnovými délkami od 390 nm do 760 nm vytvářející spektrum barev od fialové po červenou (asi 48 % energie celkového elektromagnetického slunečního záření před vstupem do atmosféry). Tvoří asi 45 % dopadajícího záření, přičemž jeho podíl je vyšší při zatažené obloze (může dosáhnout až 60 %). (www.wikipedia.cz)
6. Infračervené sluneční záření, které má vlnové délky větší než 760 nm a před vstupem do atmosféry tvoří přibližně 45 % z toku energie slunečního záření. (Tverskoj, P. N.; 1955)

Energie UV záření a viditelného světla je absorbována molekulami nacházejícími se v kůži a může indukovat biologickou odezvu jako je spálení či fotosenzitivita. Chromofory mohou být endogenního původu (např. DNA či melanin) nebo exogenního (např. fotosenzitizující léčiva či chemikálie). (Baron, E. D. a kol.; 2004)

### **UV záření**

Dle účinků na biologické systémy se konvenčně dělí na pásma dlouhovlnného UVA záření (320 – 400 nm), středněvlnného UVB záření (290 – 320 nm) a krátkovlnného UVC záření (200 – 290 nm). Ozón však absorbuje všechno UVC a velkou část UVB záření, takže ultrafialové spektrum na Zemi je tvořeno především UVA (asi 95%) a malou částí UVB záření. UVB penetruje pouze do vrchní vrstvy dermis a primárně způsobuje erytém nebo spálení. UVA je schopno přenosu přes tabuli skla a dostává se hlouběji do kůže (hlubší vrstvy epidermis a dermis), protože delší vlnové délky UVA se tolik nerozptylují jako kratší UVB. (Baron, E. D. a kol.; 2004)

Expozice UV záření vyvolává řadu nežádoucích účinků: záněty až rakovinu kůže, snížení fotosyntetické aktivity rostlin, záněty oční rohovky a spojivky. (Prokeš, J a kol.; 1997)

#### **2.3.2. Mechanismus fotosenzitivity**

Topické fotosenzitizéry mohou být jak původem přírodní (např. rostlinné, dehet), tak chemické preparáty (např. kosmetika, barvy, mléka na opalování, insekticidy). (Baron, E. D. a kol.; 2004)

Fototoxické účinky byly zaznamenány u mnoha typů chemických látek. Jejich společným znakem je schopnost absorbovat světelnou energii v oblasti slunečního světla. Podle prvního zákona fotochemie (Gotthaus-Draperův zákon) vyžaduje fotoreakce dostatečnou absorpci světelných kvant. (Směrnice komise 2000/33/ES)

Když světlo interaguje s fotosenzitizující chemikálií, zvláště se sloučeninou s rezonanční strukturou, tj. se střídáním jednoduché a dvojně vazby nebo s halogenovanými aromatickými kruhy, elektrony excitují do nestabilních singletových či tripletových stavů. Singletový stav je přechodný a může se dále konvertovat na

stabilnější méně-energetický tripletový stav, který se více zapojuje do fotoreakcí v biologických systémech.

Fotoaktivace chromoforů vede k excitaci elektronů ze singletového stavu do tripletového. Když se elektron tripletového stavu vrací do základního, vyzařuje se energie, která se může přenést do tvorby reaktivních kyslíkových meziproductů (singletový kyslík, superperoxid, hydrogenperoxid). Tyto pak oxidují lipidy, nukleové kyseliny a proteiny.

Většina makromolekul tvořících buňku je vnímavých vůči oxidativní degradaci. Membránové lipidy se nejrychleji oxidují především v místech nenasycení. Výsledkem jsou trhliny a roztržení na kratší mastné kyseliny a tím porušení buněčné membrány. (Baron, E. D. a kol.; 2004)

### **2.3.3. Fototoxicita léčiv**

Fototoxicita je definována jako toxická odezva vyvolaná po první expozici kůže určitým chemickým látkám a následné expozici světlu nebo podobně vyvolaná ozářením kůže po systémovém podání chemické látky. (Směrnice komise 2000/33/ES)

Byly identifikovány tři oddělené kroky v mechanismu vzniku fototoxicity indukované léčivem: léčivo nebo aktivní metabolity musí dosáhnout povrchových buněk kůže, světlo vhodné vlnové délky musí proniknout kůží, a fotony světla musí být absorbovány chemikálií citlivé na světlo. Teoreticky tato reakce nevzniká během prvního vystavení látky, ale dokud se nedosáhne dostatečné koncentrace chemikálie při vhodné vlnové délce.

Na rozdíl od fototoxicity potřebuje fotoalergická reakce indukční a vyvolávající fázi, zasahuje méně osob a není závislá na koncentraci agens a délce expozice. Je to následek buňkami zprostředkované hypersensitivity aktivované alergenem nebo produkované efektem světla na léčivo. Reakce je mediována lymfocyty a je charakterizována jako zpožděná reakce hypersensitivity. (Baron, E. D. a kol.; 2004)

Fotoalergie je získaná imunologická reaktivita, ke které nedochází při první aplikaci chemické látky a světla a která vyžaduje indukční dobu jeden nebo dva týdny před tím, než lze reakci kůže prokázat. (Směrnice komise 2000/33/ES)

Reakce fototoxicity je v podstatě okamžitá a běžně se projevuje přehnaným spálením vyskytující se na exponovaných oblastech kůže. Byly diferencovány tři typy fototoxické odpovědi:

1. Silně zpožděný erytém a edém se začátkem 8 – 24 hodin po expozici, trvající 2 – 4 dny charakteristický pro furokumariny.
2. Mnohem rychlejší, pomíjivý erytém s okamžitým začátkem (30 minut) trvající 1 – 2 dny. Nevyskytuje se edém, ale je patrné pálení a svědění. Tento typ odpovědi je spojený s demeklocyklinem a deriváty dehtu.
3. Rychlé, přechodné místní edémy kůže vzplanou s pálivým pocitem. Tento typ odezní rychle a je charakteristický pro porfyriny.

Všechny fototoxické odpovědi jsou závislé na dávce fotosenzitizéru a intenzitě slunečního světla. Buněčný terč fototoxinů závisí na jejich biodistribuci. Topicky aplikované agens pravděpodobně poškodí keratinocyty, protože se léčiva koncentrují v jejich oblasti. Orální a parenterální agens více poškozuje mastocyty a endoteliální buňky dermis. Subcelulární cíle pak závisí na fyzikálně chemických vlastnostech sloučenin, obzvláště na jejich liposolubilitě - hydrofilní substance více poškozuje buněčné membrány, zatímco hydrofobní rozptylující se do buněk více poškozuje cytoplazmatické nebo jaderné komponenty.

Klinickým obrazem je akutní dermatitida, vážné a nepřiměřené spálení s erytémem, edémem a v závažných případech puchýřnatým rozvojem.

Fototoxická reakce po topických přípravcích je mnohem závažnější než po systémově podávaných. (Baron, E. D. a kol.; 2004)

### **Fototoxická agens**

Topická agens mohou způsobovat přímou kožní fototoxicitu. Mezi nejčastější činitele fototoxicity patří furokumariny nacházející se kromě topických přípravků pro fotochemoterapii též v preparátech na opálení a parfémeh, dále dehet a jeho deriváty.

Mezi systémová agens patří některá antibiotika, nesteroidní protizánětlivé látky, retinoidy, fenotiaziny, amiodaron, hypolipidemika, hypoglykemika, diuretika,

cytostatika, antidepresiva, antianxiózní látky a látky požívané jako potravinářská aditiva.

### ***Antibakteriální chemoterapeutika***

Tetracykliny patří mezi nejvíce frekventované případy fototoxické reakce vzhledem k častosti jejich používání. Demekloxyklin a doxycyklin jsou nejsilnějšími fotosenzitizéry, zatímco minocyklin a methacyklin vykazují nižší efekt kvůli lepší orální absorpci. Některé subcelulární cíle reaktivního kyslíku vznikajícího z tetracyklínů byly identifikovány: ribozómy, buněčná membrána, DNA a mitochondrie.

Další fototoxická antibiotika jsou fluorochinoly, pro které jsou více vnímaví pacienti s Fitzpatrickovým typem pokožky I a II. Tato fototoxicita je charakterizována zrudnutím pokožky, pálením s následným odloupením postižené pokožky indukovaným vlnovými délkami v oblasti UVA. (Baron, E. D. a kol.; 2004)

## 2.4. Amoxicilin

### 2.4.1. Skupina penicilinů

Peniciliny jsou rozdělovány do čtyř hlavních kategorií dle různého spektra aktivity. Přírodní peniciliny (penicilin G a penicilin V) jsou aktivní proti mnoha gram-pozitivním mikroorganismům, gram-negativním kokům a některým dalším gram-negativním organismům. Polosyntetické aminopeniciliny (ampicilin, amoxicilin, bakampicilin a pivampicilin) působí proti penicilin-senzitivním bakteriím stejně jako proti *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. a *Hemophilus influenzae*. Protistafylokokové peniciliny (kloxacin, dikloxacin, flukloxacin, meticilin, nafcilin a oxacilin) jsou aktivní proti stafylokokům produkujícím beta-laktamázu. Antipseudomonádové peniciliny (karbenicilin, mezlocilin, piperacilin a tikarcilin) působí méně na gram-pozitivní mikroorganismy než přírodní a aminopeniciliny, ale o to více jsou aktivnější proti gram-negativním bacilům včetně *Pseudomonas aeruginosa*.

Peniciliny jsou baktericidní, inhibují syntézu bakteriální buněčné stěny. Vliv penicilinů je závislý na dosažení tzv. proteinů vázících peniciliny (penicillin-binding proteins – PBPs) lokalizovaných na vnitřní membráně buněčné stěny. PBPs jsou enzymy, které se zapojují v terminálním stádiu do kompletace bakteriální stěny a jejímu vytvarování během růstu a dělení. Peniciliny způsobují zeslabení buněčné stěny a tím lýzu buňky.

Rezistence proti penicilinům je způsobena třemi mechanismy:

1. změna cíle působení antibiotika, PBPs;
2. inaktivace penicilinů enzymy bakterií (beta-laktamázami);
3. snížení propustnosti antibiotika buněčnou stěnou.

Peniciliny se dostávají do většiny tkání a tělních tekutin, včetně peritoneální tekutiny, a ve vysokých koncentracích se nacházejí i v moči. Distribuce do mozkomíšního moku je pouze u pacientů s meningitidou a tvoří asi 5 % koncentrace krevní plazmy.



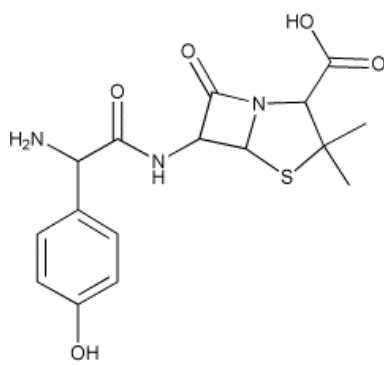
Peniciliny jsou eliminovány primárně renálně (glomerulární filtrací a tubulární sekrecí). Jaterní metabolismus většiny penicilinů se podílí na celkové eliminaci méně než 30 %, s výjimkou nafcilinu a oxacilinu. Některé peniciliny (ampicilin, mezlocilin, nefcilin, penicilin G, piperacilin, pivmecilinam) mohou být vylučovány ve vysokých koncentracích žluči. Asi 10 % kloxacilinu, dikloxacilinu, flukloxacilinu a oxacilinu se znovu obnovuje v žluči. (USP DI®)

Tabulka objasňující vybrané aspekty farmakokinetiky jednotlivých léčiv ze skupiny penicilinů (USP DI®):

Léčivo	Absorpce po p.o. podání (%)	Maximální sérová koncentrace (hod)	Vazebnost na proteiny (%)	Jaterní biotransformace (%)	Renální eliminace (% nezměněného léčiva)	Distribuční objem (L/kg)
Amoxicilin	75-90	1-2 (p.o.)	nízká (20)	10	60-75	0,36
Ampicilin	35-50	1,5-2 (p.o.) 1 (i.m.)	nízká (20)	10	75-90	0,29
Bakampicilin	35-50	0,5-1 (p.o.)	nízká (18-20)	10	70-75	0,29
Karbenicilin	30	0,5-1 (p.o., i.m.)	střední (50)	0-2	36 (p.o.) 75-95 (i.v.)	0,12
Kloxacilin	50	1-2 (p.o.)	velmi vysoká (95)	20	30-60	0,11
Dikloxacilin	37-50	0,5-1 (p.o.)	velmi vysoká (95-98)	10	50-70	0,08
Flukloxacilin	30-50	1 (p.o.)	velmi vysoká (94)		50-65	
Meticilin		0,5-1 (i.m.)	nízká až střední (40)	10	60-80	0,36
Mezlocilin		0,5-1 (i.m.)	nízká až střední (16-42)	20-30	55-60	0,23
Nafcilin	proměnlivá; nízká	1-2 (p.o.) 0,5-1 (i.m.)	vysoká (90)	60-70	11-30	1,1
Oxacilin	30-35	0,5-1 (p.o., i.m.)	vysoká (90-94)	45	55-60	0,4
Penicilin G (p.o.) (p.e.) Benzatin (i.m.) Prokain (i.m.)	15-30	1-2 (p.o.)  24  4	střední (60)	20	20 60-90	0,5-0,7
Penicilin V	60-73	0,5-1 (p.o.)	vysoká (80)	55	20-40	0,5
Piperacilin		0,5 (i.m.)	nízká (16)	20-30	60-80	0,23
Pivampicilin	35-50	1 (p.o.)	nízká (20)	10	25-30	
Pivmecilinam	nízká	0,5-1,5 (p.o.)	nízká (5-10)		60-80	
Tikarcilin		0,5-1 (i.m.)	střední (45-60)	15	60-80	0,16

## 2.4.2. Amoxicilin

Vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S



*Synonyma:* amoxicilin, amoxicillin, amoxicilin sodný.

*Zařazení:* antibakteriální chemoterapeutika, peniciliny, aminopeniciliny.

*Molekulární hmotnost:* amoxicilin 365,40 g/mol.

*Rozpustnost:* mírně rozpustný ve vodě a metanolu a nerozpustný v tetrachlormetanu, chloroformu a benzenu. (DRUGDEX<sup>®</sup> Evaluations)

*Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda:* 0,61 ± 0,38 (Kümmerer, K.; 2001)

*Indikace:* bakteriální endokarditida; ušní (otitis media), nosní (sinusitis) a krční infekce (tonsillitis recurrens); infekce gastrointestinálního traktu vyvolané bakterií *Helicobacter pylori*; infekce kůže a měkkých tkání vyvolané *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* nebo *Bacteroides species*; infekce urogenitálního traktu (např. cystitis, urethritis, pyelonephritis, infekce ženského genitálu způsobené kmeny Enterobacteriaceae - zvl. *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* nebo *Enterococcus species*, a gonorrhoea) a dolních dýchacích cest, např. akutní a chronická bronchitida, lobární pneumonie a bronchopneumonie; infekce kostí a kloubů, např. osteomyelitis; lymeská borelióza a další bakteriální infekce způsobené citlivými streptokoky, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *H. influenzae* a *N. gonorrhoe*. (DRUGDEX<sup>®</sup> Evaluations)

Amoxicilin je součástí těchto humánních léčivých prostředků registrovaných na území České republiky v různých lékových formách: Amoclen<sup>®</sup>, Amoksiklav<sup>®</sup>, Amoxicillin-Ratiopharm<sup>®</sup>, Amoxihexal<sup>®</sup>, Augmentin<sup>®</sup>, Amoxicillin Léčiva<sup>®</sup>, Betaklav<sup>®</sup>, Curam<sup>®</sup>, Duomox<sup>®</sup>, Enhancin<sup>®</sup>, Forcid Solutab<sup>®</sup>, Megamox<sup>®</sup>, Ospamox<sup>®</sup>. Je

součástí i veterinárních léčivých přípravků: Amoxicillin Bioveta<sup>®</sup>, Amoxid<sup>®</sup>, Amoxykel<sup>®</sup>, Amoxycol<sup>®</sup>, Amoxygal<sup>®</sup>, Amoxyveto<sup>®</sup>, Aureomix<sup>®</sup>, Clamoxyl<sup>®</sup>, Codimox<sup>®</sup>, Duphamox<sup>®</sup>, Hipramox<sup>®</sup>, Hostamox<sup>®</sup>, Microamox<sup>®</sup>, Nisamox<sup>®</sup>, Noroclav<sup>®</sup>, Octacillin<sup>®</sup>, Rimox<sup>®</sup>, Simivet<sup>®</sup>, Suramox<sup>®</sup>, Synulox<sup>®</sup>, Trioxyl<sup>®</sup>, Uni-Amoxicilin<sup>®</sup>, Vetrimoxin<sup>®</sup>, Veyxyl<sup>®</sup>, Xiclav<sup>®</sup>, Zoobiotic<sup>®</sup>. (MV AISLP; 2008.1)

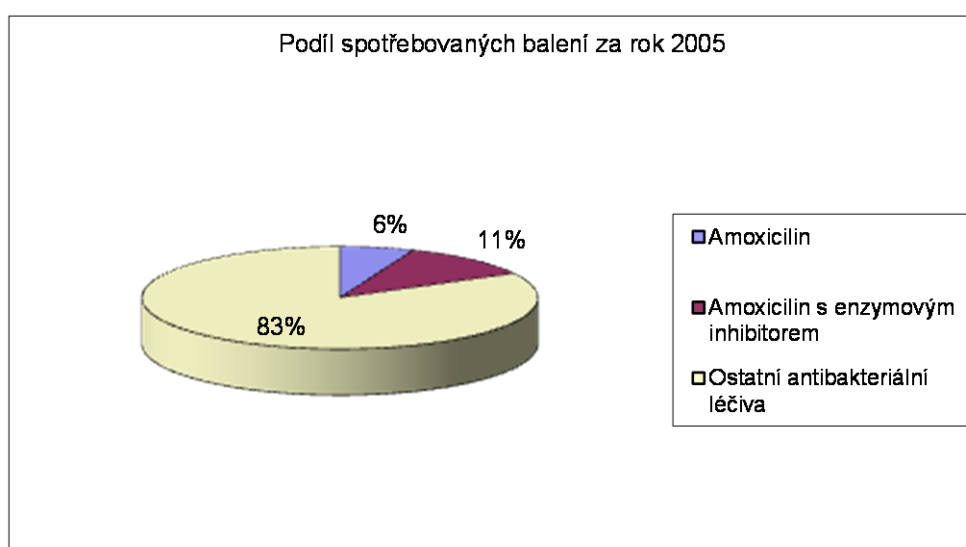
### **2.4.3. Spotřeba antibakteriálních léčiv a amoxicilinu v České republice**

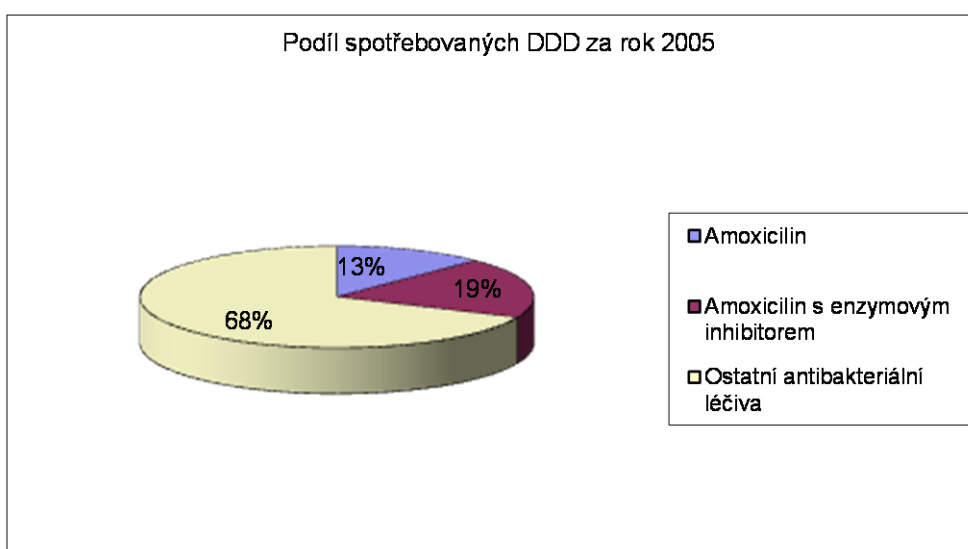
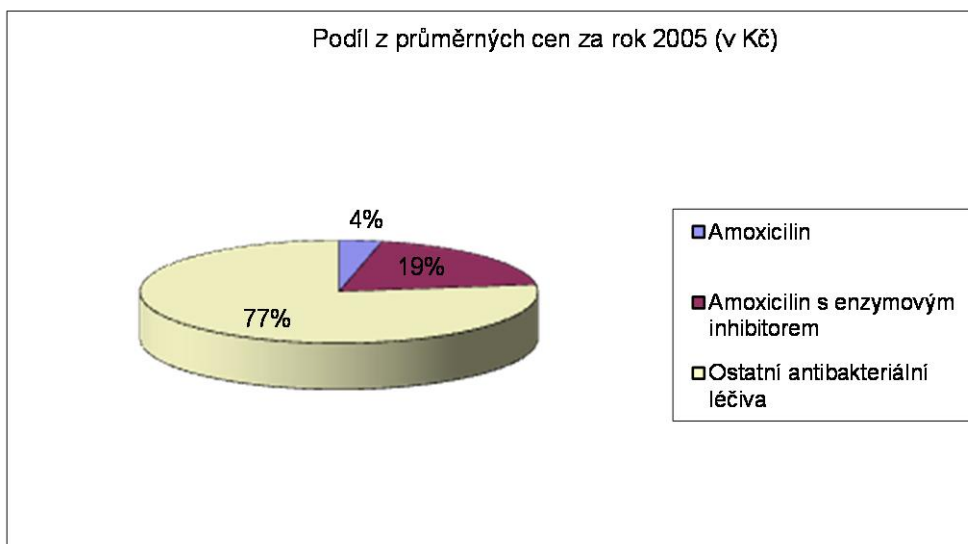
#### **2.4.3.1. Spotřeba za rok 2005**

Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii 12 244 127 balení za průměrnou cenu 2 742 720 526 Kč, což odpovídá 74 555 300 spotřebovaných definovaných denních dávek (DDD), tj. 19,9853 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

Na amoxicilin z toho připadá 738 234 balení za průměrnou cenu 95 661 140 Kč, což odpovídá 9 228 126 DDD, tj. 2,4737 DDD/t.o./d.

Na amoxicilin s enzymovým inhibitorem připadá 1 359 453 balení za průměrnou cenu 531 072 171 Kč, což odpovídá 14 349 363 DDD, tj. 3,8465 DDD/t.o./d. (MV AISLP; 2007.3)





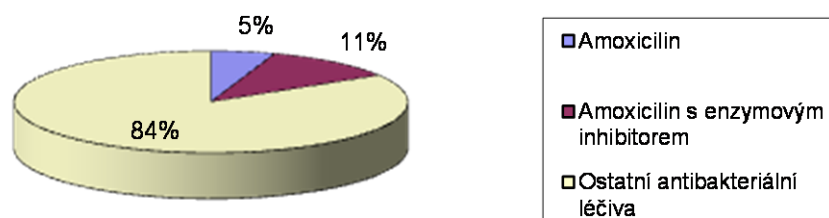
#### 2.4.3.2. Spotřeba za rok 2006

Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii 11 319 372 balení za průměrnou cenu 2 401 955 017 Kč, což odpovídá 67 834 694 DDD, tj. 18,1297 DDD/t.o./d.

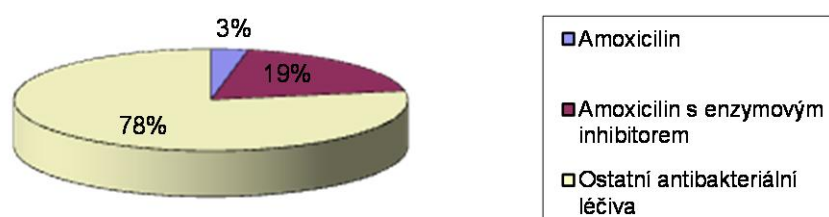
Na amoxicilin z toho připadá 594 228 balení za průměrnou cenu 73 264 212 Kč, což odpovídá 7 301 576 DDD, tj. 1,9514 DDD/t.o./d.

Na amoxicilin s enzymovým inhibítozem připadá 1 244 009 balení za průměrnou cenu 460 808 882 Kč, což odpovídá 12 774 417 DDD, tj. 3,4141 DDD/t.o./d. (MV AISLP; 2007.3)

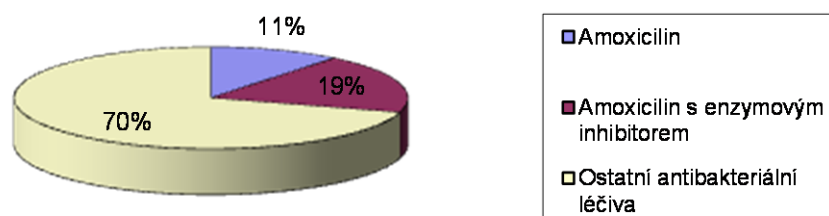
Podíl spotřebovaných balení za rok 2006



Podíl z průměrných cen za rok 2006 (v Kč)



Podíl spotřebovaných DDD za rok 2006



#### **2.4.4. Ekotoxikologické testy na amoxicilinu**

Dle skupiny okolo Andreozziho mohou být abiotické podmínky – hydrolýza a přímá fotolýza – odpovědné za transformaci a odstranění amoxicilinu z vodného prostředí, zvláště ve slabě bazickém prostředí. Množství vzniklého produktu přímou fotolýzou za katalýzy slunečního záření bylo vypočteno na základě kinetické konstanty a poločasu rozpadu. Jejich experimenty s nepřímou fotolýzou v přítomnosti přirozených fotosenzitizérů (dusičnanové ionty a huminové kyseliny) ukázaly, že dusičnanové ionty neměly žádný vliv na rychlost fotodegradace amoxicilinu, zatímco huminové kyseliny byly toho schopné. Řasové biologické zkoušky ukázaly, že v rozsahu koncentrací od 50 ng/l do 50 mg/l není amoxicilin toxický vůči eukaryotickým organismům, jako jsou řasy z čeledi Chlorophyceae *Pseudokirkneriella subcapitata* a *Closterium ehrenbergii* a Bacillariophyceae *Cyclotella meneghiniana*, ale ukázal značnou toxicitu vůči Cyanophyta *Synechococcus leopolensis*. (Andreozzi, R. a kol.; 2004)

Nathason a kol. zkoumal potenciální nepříznivý efekt na vývoj ledvin laboratorního potkana. Hodnotili efekty na mláďata po příjmu amoxicilinu březí samicí. Březí laboratorní potkani byli vystaveni denním dávkám 100 mg/kg po dobu pěti dnů, ve kterých probíhala počáteční renální organogeneze. U mladých zvířat exponovaných amoxicilinem in utero byla prezentována mírná oligonefronie a tubulární retenční cysta, což se ukázalo jako škodlivé. (Nathason, S. a kol.; 2000)

Řasová toxicita amoxicilinu při chovu ryb byla studována skupinou okolo Lutzhofta. Efekty na inhibici růstu byly modifikovány na základě procesů popsanych v protokolu ISO 8692 z roku 1989 na třech řasách. Řasový růst byl měřen pomocí vzrůstající koncentrace chlorofylu po extrakci ethanolem s následným měřením fluorescence. U sladkovodní *Microcystis aeruginosa* byla zjištěna hodnota toxicity EC<sub>50</sub> pro amoxicilin 0,0037 mg/l, pro mořskou řasu *Rhodomonas salina* byla 3108 mg/l a pro sladkovodní zelenou řasu *Selenastrum capricornutum* byla zjištěna hodnota NOEC větší než 250 mg/l. (Lutzhoft, H. a kol.; 1999)

Dle Adlera se beta-laktámy v přírodě nacházejí zřídka, pravděpodobně kvůli rychlé degradaci chemicky nestabilního laktámového kruhu.

Jjemba se vyjádřil, že negativní dopad terapeutických sloučenin na rostliny byl ve většině případů určen na základě in vitro experimentů v takových koncentracích, které se s největší pravděpodobností nevyskytnou v polní půdě.

Negativní dopad kontaminovaného hnoje na půdu je více spojen s dusičnany a těžkými kovy než s antibiotiky. Po hnojení zahrádek mrvou z dobytčích chovů chovaných pro mléko se zjistila rezistence půdních mikroorganismů s frekvencí 70 % proti ampicilinu, penicilinu, tetracyklinu a vankomycinu. (Sören, T.-B.; 2003)

Ve Velké Británii, kde amoxicilin patří mezi 10 nejčastěji předepisovaných léčiv, skupina okolo Pascoea testovala akutní a chronickou toxicitu na žahavci nezmaru obecném (*Hydra vulgaris*). Po sedmi dnech expozice nebyl pozorován žádný efekt až do koncentrace 1,0 mg/l a po 17 dnech nebylo nepříznivě ovlivněno krmení a ani tvorba pupenů. (Pascoe, D.; 2003)

Skupina okolo Radky Alexy zkoumala biologickou odbouratelnost 17 antibiotik. Test kombinoval Zahn - Wellensův test (OECD 302 B) a test vývoje CO<sub>2</sub> (OECD 301 B). Kombinace těchto testů byl vhodný nástroj hodnotící chování chemikálií v jednom testu. Pouze amoxicilin, imipenem a nystatin ukazoval spolehlivou úplnou biodegradaci jen v několika paralelních baňkách a mohly tak být považovány za částečně odbouratelné s tvorbou stabilních metabolitů. (Alexy, R.; 2007)

## **2.5. Testované organismy**

### **2.5.1. Artemia salina, L.**

#### **Taxonomické zařazení**

Kmen: *Arthropoda* (**Členovci**)

Kmen členovci je nejpočetnější skupina organismů s vysokým stupněm tělesné organizace. Tělo je složeno z několika segmentů, článkované jsou rovněž končetiny, kryté chitinem. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Podkmen: *Crustacea* (**Korýši**)

Zahrnují milimetrové až několik desítek centimetrů velké, převážně vodní členovce. Tělo i končetiny mají článkované. Počet článků je proměnlivý (10 – 50).

Jsou to převážně vodní členovci, velmi málo druhů je suchozemských, ale i tyto preferují vysokou vzdušnou vlhkost. Článkované tělo je členěno na oddíly (tagmata): hlava, hrud' a zadeček. Často dochází ke srůstu několika hrudních článků s hlavovým oddílem za vzniku hlavohrudí. U starobylých forem je členění těla na hlavu a trup (truncus). Tělo je kryté kutikulou, která může být silně inkrustována uhličitanem vápenatým a vytvářet tak krunýř.

Končetiny jsou buď' jednovětevné a slouží pak obvykle k lezení nebo jsou rozeklané, dvouvětevné (birámní) – ty slouží většinou k plavání, přihánění a filtraci potravy, dýchání aj.

Hlava je zakončena akronem (první tělní článek, který je bez končetin) a dalšími pěti články nesoucí orgány končetinového původu: antenuly a anteny (tykadla prvního a druhého páru), mandibuly (kusadla) a dva páry maxil (čelistí). Hrud' je z různého počtu článků, končetiny na prvních třech člancích jsou často modifikovány v maxilipedy (čelistní nožky). Ostatní hrudní končetiny mají běžně pohybovou funkci, mohou také sloužit k dýchání, filtraci potravy nebo k rozmnožování. Poslední tělní článek je bez končetin a bývá v něm řitní otvor. (Sedlák, E.; 2003)

Trávicí soustava je trubicovitá, různě diferencovaná. Dýchacími orgány jsou žábry ve formě epipoditových přívěsků na končetinách. Cévní soustava je otevřená s dominující dorzální cévou. Vylučovacími orgány jsou modifikovaná metanefridia buď'



u báze druhého páru čelistí – maxilární žlázy, nebo u druhého páru tykadél – antenální žlázy. Nervová soustava je u nižších tříd korýšů tvořena párovitými ganglii v jednotlivých tělních člancích těla, přičemž první je největší. U rakovců dochází ke splývání ganglií v hlavě s vytvořením mozkového ganglia děleného na tři části. Jako smyslové orgány mohou být vytvořeny různé mechanoreceptory umístěné nejčastěji na tykadlech. (Sedlák, E.; 2003) Dýchají žábrami. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Korýši jsou většinou gonochoristi, někdy je přítomna parthenogenese. Pohlavní žlázy jsou párovité a mají párovité vývody. U nižších tříd je výrazný pohlavní dimorfismus – samci bývají menší. Vývoj je přímý nebo přes larvální stádium. Typů larev je mnoho, ale základními typy jsou nauplius a zoea. (Sedlák, E.; 2003)

Korýši jsou vázáni na vodu nebo alespoň na vlhké prostředí. Většina z nich žije v mořích. Objevují se ve všech hloubkách. Většinou žijí benticky, někteří se přizpůsobili planktonickému nebo nektonnímu způsobu života. Mnozí korýši jsou filtrátoři, někteří jsou dravci nebo paraziti.

#### Třída: ***Branchiopoda (Lupenonožci)***

Drobní korýši, převážně sladkovodní. Hrudní nožky jsou lupenité, nesou žábry a slouží také k filtraci potravy a často i jako pohybové orgány. Antenuly jsou zakrnělé, čelistní nožky nejsou vytvořeny. Zadeček je celý bez končetin, na jeho posledním článku bývá běžně pár přívěsků (furka). (Sedlák, E.; 2003)

Tělo není pokryto zádovním štítem, ani dvouchlopňovou schránkou. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

#### Řád: ***Anostraca (Žábronožky)***

*Anostraca* mají tělo dlouze protáhlé a ze stran smáčknuté. Tělo je tvořeno hlavou, 11 hrudními články a 9 zadečkovými články s furkou (ploutvovité lupínky). Hrudní končetiny nesou po 1 páru listovitých nožek, antenuly jsou bičíkovité. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Mají jantarově zbarvené tělo je bez krunýře, délky asi do dvou centimetrů. Na hlavě jsou složené oči na stopkách, mezi nimi je jednoduché naupliové očko. Hrudní nožky slouží k plavání, dýchání i k filtraci potravy. Žábronožky plavou v typické poloze otočené hřbetem dolů, výjimečně při víření a filtraci sedimentu se přetácejí. Anteny samečků jsou zvětšené, hákovité, druhově specifické a slouží k přichycení na samici při kopulaci (tzv. objímavé končetiny).

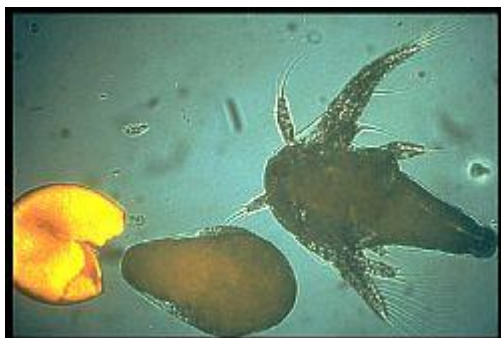
Larvárním stadiem je nauplius, který má jedno naupliové očko, první tři páry tělních končetin, oválný tvar těla. Během růstu a svlékání se nauplius mění v metanaupliová stadia nebo kopepoditovou či cyprisovou larvu.

Celkem je známo přes 180 druhů žábřonožek, z nichž na našem území bylo zjištěno pět druhů. (Sedlák, E.; 2003)

**Druh: *Artemia salina*, L. (Žábřonožka solná)**

*Artemia salina* je kosmopolitním druhem slaných vnitrozemských vod (saliny). Běžně se vyskytuje v pobřežních slaných jezerech Rumunska a Floridy, známa je rovněž z Německa a stepních oblastí Ruska. Je euryhalinní. Jejími nauplii jsou krmeny potěry akvarijních ryb. (Sedlák, E.; 2003)

Dorůstá 12-18 mm a žije až 4 měsíce. Na hlavě má nečláňkovaná nitkovitá tykadla prvního páru a mohutná tykadla druhého páru, která mají u samců tvar dvoučláňkových kleští (u samic jsou drobná a méně nápadná). Tykadla samců slouží k přidržování samičky při kopulaci. Z jejich základního článku často vyrůstají různé charakteristické výrůstky, jež slouží jako dobré determinační znaky. Na předním okraji hlavy se mezi tykadly někdy nachází nepárový čelní výrůstek. Na spodní straně hlavy je ústní ústrojí. Na čele jedno nepárové naupliové očko, na bocích hlavy se nalézají velké stopkaté složené oči. Hrud' se skládá z jedenácti článků, z nichž každý nese ventrálně pár listových plovacích nožek. Zadeček se skládá z devíti článků; první dva články jsou spolu víceméně srostlé, nesou pohlavní orgány. U samic bývá v těchto místech upevněn nápadně zbarvený vak s vajíčky. (Kočí, V. a kol; 2001b)



Vylíhlý nauplius a nauplius (foto: [www.captain.at/artemia/](http://www.captain.at/artemia/))

### **2.5.2. *Brachionus calyciflorus***

#### **Taxonomické zařazení**

Kmen: *Rotifera* (**Vířníci**)

Vířníci jsou mikroskopičtí bilaterálně symetriční živočichové. Patří mezi drobné mikroskopické živočichy obývající převážně vodní biotopy. Najdou se však mezi nimi i druhy žijící v mechu, půdě nebo dokonce ve vlhkém opadu tropického lesa. Z celkem asi 2000 popsaných druhů vířníků jsou pouze dva z nich součástí planktonu volného oceánu a dalších asi 50 druhů je považováno za striktně mořské.

Délka jejich nesegmentovaného těla se pohybuje mezi 40 a 2000  $\mu\text{m}$ . Kolonie některých druhů mohou mít velikost až 5 mm. Segmentace je pouze vnější (nepravá). Tělo se obvykle sestává ze tří základních částí – hlavy, trupu a nohy. Může se dále vyčleňovat i krk, který je viděn jako zřetelné a různě dlouhé zúžení těla mezi hlavou a trupem.

Hlavová část je opatřena výraznou korunou (vířivým ústrojím) sloužícím k pohybu a získávání potravy. Vířivý aparát, který může být u jednotlivých druhů různě modifikován, tvoří tři základní oblasti – apikální, cirkumapikální (okružní pás brv) a příústní pole.

Tělo vířníků pokrývá syncytiální integument – jednovrstevná pokožka se splynulými buňkami, tzv. syncitiem (soubunním). Počet jader u jednotlivých druhů vířníků je stálý. Pokožka na povrchu formuje různě silnou kutikulu, která může vytvářet loriku (krunýř), podle které je možné jednotlivé druhy identifikovat. K produktům integumentu patří i jiné struktury, například ploutvičky u rodu *Polyarthra*, které slouží k usakování od případného predátora. Kromě loriky může být tělo vířníka kryto i nejrůznějšími rosolovými obaly. Vertikálně nebo častěji terminálně vybíhá z těla noha s prsty. Počet prstů může být od žádného po čtyři. Do nohy ústí u mnoha vířníků cementová (lepová) žláza. ([www.rotifera.cz](http://www.rotifera.cz))

Morfologická variabilita vířníků se dá rozdělit do několika základních skupin případů: cyklomorfózy, potravního polymorfismu a predátorem indukovaného polymorfismu. Pojem cyklomorfóza se označují změny tvaru těla během roku jako adaptace na měnící se abiotické (změny viskozity vody apod.) nebo biotické (predace apod.) podmínky prostředí. Projevuje se změnami ve velikosti těla, v pigmentaci

a modifikacemi povrchových struktur. Cyklomorfóza bývá nápadná zejména u druhů s pevnou schránkou. Potravní polymorfismus vykazují především druhy rodu *Asplanchna*. Jedná se o reakci na produkty primárních producentů – např. vitamínu E, po jehož působení se rodí potomci ve tvaru kříže (tzv. kruciformní tvar). Nejčastěji zmiňovaným příkladem morfologické variability u vířníků je predátorem indukovaný polymorfismus u rodu *Brachionus*. Predátor působí látkami nejrůznější chemické povahy (tzv. kairomony) na populaci kořisti, která v dalších generacích vytváří potomstvo hůře dostupné pro predátora.

Trávicí soustava vířníků, která je u jednotlivých druhů různě modifikována, se obecně skládá z ústního otvoru, hltanu, mastaxu (žvýkadla s kousacím ústrojím), kam ústí slinné žlázy, dále jícnu, žaludku, střeva a řitního otvoru. Mastax je důležitým taxonomickým znakem (často pomáhá s determinací až do druhové úrovně) a sestává se ze dvou částí – kladívka (*maleus*) a kovadlinky (*incus*). Soustava končí kloakou, do které ústí i vejcovody a protonefridie. U samců trávicí soustava v drtivé většině případů chybí nebo je velmi zakrnělá.

Vířníci mají oba základní typy svalů – hladké i příčně pruhované. Pruhy jsou jednoduché a vedou tělem longitudiálně nebo cirkulárně. Díky svalům bývají kontrolovány různé výběžky těla, štěty či ploutvičky, které slouží k úniku od predátora. Pohybují se po šroubovici díky činnosti vířivového orgánu nebo provádí náhlé skoky.

Centrální nervovou soustavu tvoří mozková uzlina. Z ní a několika dalších menších ganglií vybíhají nervy k nejrůznějším orgánům. Vyskytuje se i retrocerebrální orgán, jehož funkce zatím není zcela známá.

Vylučování se děje protonefridiemi (plaménkovými buňkami) přítomnými v počtech 4-6 po stranách těla. ([www.rotifera.cz](http://www.rotifera.cz))

Dýchají celým povrchem těla. (Ambrožová, J.; 2002)

U většiny druhů známe samce a rozmnožování probíhá cyklickou partenogenezí (heterogonicky). Heterogonie spočívá v opakování amiktické a miktické fáze. Samičí gonáda se skládá z vaječníku a syncytiálního vitelária, které produkuje žloutek. Vaječník i vitelárium obklopuje folikulární vrstva. Malí samci nesoucí asi 50 spermií žijí často jen pár dní nebo maximálně týden. Většina vířníků je oviparních. Někteří nosí vajíčka na těle, jiní je připevňují k substrátu nebo je vypouštějí do vody a vajíčka se stávají

součástí planktonu. Existují i druhy ovoviparní, tzn. zadržující embrya v těle do doby, než se z nich stane nový vírník.

Důležitou roli hrají v přirozených procesech samočištění a čištění odpadních vod. Vírníci se využívají i jako zkušební materiál v ekotoxikologických biotestech. Ve světě má velkou tradici i masový chov vírníků v akvakulturách. ([www.rotifera.cz](http://www.rotifera.cz))

**Třída: *Monogononta (Točivky)***

Jedná se o největší skupinu vírníků žijících benticky, přisedle nebo planktonním způsobem života. Pohlavní žláza je vždy nepárová a produkují i samečci.

**Řád: *Ploima (Krunýřenky)***

Tato skupina dnes obsahuje celkem 21 čeledí zahrnujících 3/4 druhové diverzity vírníků. ([www.rotifera.cz](http://www.rotifera.cz))

Noha má dva prsty s lepovými žlázkami. Nepřisedají a nežijí v pouzdrech. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

**Čeleď: *Brachionidae***

Krunýř, který kryje jen trup, je souvislý bez postranních podélných štěrbin. Noha je hustě kroužkovaná, článkovaná či chybí. Dva prsty nejsou nápadně velké. (Říhová Ambrožová, J; 2007)

**Druh: *Brachionus calyciflorus***

Lorika je hladká a průhledná, jeví se jako jeden celek. Délka těla je 180 – 570  $\mu\text{m}$  a šířka 124 – 300  $\mu\text{m}$ . Hlavní potravu tvoří *Chlorella pyrenoidosa* a bakterie.

Nohu, která je hustě kroužkovaná, má vždy vyvinutou se dvěma prsty. Na zadním okraji krunýře je při zastrčení nohy vidět výřez pro výstup nohy. (Ambrožová, J.; 2002)

Jedním z morfologických znaků, které rozlišují jednotlivé vírníky, je predátorem indukovaný polymorfismus. Ten se projevuje tím, že v přítomnosti kairomonu rodu *Asplanchna* sp. tvoří dlouhé ohebné ostny znemožňující predátorovi snadné ulovení kořisti. ([www.rotifera.cz](http://www.rotifera.cz))



*Brachionus calyciflorus* (foto: An Image-Based Key To The Zooplankton Of The Northeast, 2008)

### **2.5.3. Sinapis alba, L.**

#### **Taxonomické zařazení**

Třída: *Rosopsida* (*Vyšší dvouděložné rostliny*)

Řád: *Capparales* (*Brukvotvaré*)

Stromy, keře, nejčastěji byliny obsahují myrosinové buňky a buňky bohaté na proteiny. Dále obsahují sirné glukosinoláty, protoalkaloidy, kyanogenní glykosidy, brassicasteroidy, mastné kyseliny (eruková, olejová, linolová), sinapovou a ferulovou kyselinu, kardioaktivní glykosidy, barvivo anthokyanového původu – rubobrassicin.

Čeleď: *Brassicaceae* (*Brukvovité*)

Jsou to jednoleté až vytrvalé byliny, zřídka keřiky, s jednoduchými nebo větvenými trichomy chlupaté, žláznaté nebo lysé. Listy mají střídavé nebo pouze přízemní, jednoduché celistvé nebo do různého stupně členěné až složené, bez palistů; myrosinové buňky jsou v mezofylu nebo při cévních svazcích.

Květenství je hroznovité, často skládající složené latovité květenství, za plodu se prodlužující, bez listěnců, s listeny nebo bez nich. Květy jsou oboupohlavné, bisymetrické (zřídka slabě souměrné), zpravidla dvouobalné se 4 kališními a 4 korunními lístky (zřídka pouze s kališními lístky); tyčinek je 6 (z nich 2 kratší), zřídka 4 nebo 2, nebo naopak až 10, pylová zrna jsou trikolpátní; při bázi tyčinek a pestíku se nachází dužnatá a živě zelená nektaria různého tvaru; gyneceum je parakarpní z 2 plodolistů s druhotnou přehrádkou placentárního původu; semeník je svrchní s větším

počtem (někdy redukcí až 2) příčných nebo obrácených dvouobalných vajíček, placentace je nástěnná; blizna je přisedlá nebo na čnělce, jednoduchá nebo ve 2 laloky rozeklaná.

Plod je suchý, nejčastěji pukavý 2 chlopněmi s blanitou přehrádkou (šešule, šešulka) nebo též poltivý ve 2 nebo více dílů nebo nepukavý. Semena mají hladké, síťované nebo důlkované osemení, které při navlhčení někdy slizovatí, bez endospermu; zárodek je zakřivený, s dělohami k sobě přitisklými a kořínkem přilehlým k jejich boční straně (zárodek, klíček bokokořenný) či k hřbetní straně jedné z děloh (klíček hřbetokořenný) či z hřbetní strany do ohybu žlábkovitě prohnutých děloh (klíček žlábkoděložný) nebo s dělohami spirálně stočenými (klíček svinutoděložný).

Existuje asi 380 rodů (3 200 druhů), rozšířených téměř po celém světě, hlavně v mírném pásmu severní polokoule, v tropech převážně v horách. (Jahodář, L.; 2006)

**Druh: *Sinapis alba*, L. (Hořčice bílá)**

Hořčice bílá, *Sinapis alba*, je to jednoletá, časně jarní rostlina – olejnina. V půdě setrvává tenkým větvenovitým kořenem. Lodyhu má vzpřímenou, roztroušeně chlupatou, až 150 cm vysokou s listy jasně zelené barvy. Květy jsou oboupohlavné čtyřčetné s chlupatými stopkami. Zpočátku jsou sestaveny v klubkaté květenství, později v protáhlé hrozny, kde jednotlivé květy kvetou odspoda.

Plody jsou odstálé, bíle štětinaté šešule.

Semeno rostliny je na brukvovité rostliny poměrně velké, je žluté nebo bělavě žluté kulovitěho tvaru. Dosahuje průměru 1,5 - 4 mm. Po vyklíčení vyrůstá jednoduchý kořen s hypokotylem. Později je kulovitý a bohatě rozvětvený. Rostlině se nejlépe daří na středně hlinitých nebo hlinitopísčitých půdách, dobře hnojených, s dostatkem vápníku a s neutrální až mírně alkalickou půdní reakcí. (Kočí, V.; 2001a)

Vyžaduje dostatek vláhy. Nízké nároky na půdu a klimatické podmínky. Daří se jí v chladnějších a vyšších oblastech. (Skládanka, J.; 2006)

Pěstuje se především pro semeno, ze kterého se vyrábějí doplňky jídel (hořčice a koření). Olej, který obsahuje semeno až z 35 %, je využíván v potravinářském průmyslu i pro technické účely na výrobu mýdel, ve farmaceutickém (semena poskytují glukosinolát sinalbin a využívají se jako emetikum a rubefaciens) a kosmetickém průmyslu. Patří zároveň mezi krmné plodiny. (Kočí, V.; 2001a)



Semena hořčice bílé (foto: Skládanka, J.; 2006)



Květenství hořčice bílé (foto: Opletal, L.; [www.faf.cuni.cz/daidalea](http://www.faf.cuni.cz/daidalea))

#### **2.5.4. Tubifex tubifex**

##### **Taxonomické zařazení**

Kmen: *Annelida* (**Kroužkovci**)

Tělo kroužkovců je zpravidla homonomně segmentováno, má ale více odlišný první tělní článek (prostomium) a jeden nebo několik srostlých článků na zádi. V každém segmentu je coelomová dutina, obvykle ve tvaru párovitých váčků. Stěny coelomových váčků jsou tvořeny mesodermálním epitelem, dutiny jsou naplněny tekutinou obsahující zásobní látky, odpadní produkty i volně pohyblivé buňky. V místech svého styku vytvářejí váčky dvoustevné mesenterium, na němž jsou fixovány některé vnitřní orgány (např. trávicí trakt a cévní soustava) nebo tyto závěsy mohou chybět, tvořit přepážky či vytvořit soustavu chodeb. Funkcí coelomu je vytváření opory (hydroskeletu) pro svalovinu, která jej obklopuje, doplnění nebo u některých kroužkovců i nahrazení cévní soustavy.

Tělní pokryv je tvořen jednovrstevným pokožkovým epitelem, který obsahuje žlaznaté buňky a je kryt kutikulou. Deriváty pokožky jsou kutikulární štětiny. Pod



pokožkou je vrstva okružní a podélné svaloviny, doplněná některými specializovanými svaly.

Trávicí soustava je úplná, dosti diferencovaná na jednotlivé typické oddíly. Ústa jsou na druhém tělním článku, řitní otvor na pygidiu. Trávicí soustava může být doplněna některými (např. vápennými) žlázami. U mnoha kroužkovců se z peritonea obklopujícího střeva diferencuje zvláštní chloragogenní tkáň, jejíž buňky mají depoziční a exkreční funkci.

Cévní soustava je uzavřená. V nejjednodušším případě je vytvořena ze hřbetní cévy (pulzující odzadu dopředu), břišní cévy a obloukovitých spojek. Toto základní složení bývá ještě doplněno dalšími cévami. Dýchání se děje pokožkou se sítí vlásečnic nebo žábry.

Vylučovacími orgány jsou u larev ještě protonefridia, u dospělců potom metanefridia. Některé primitivnější skupiny kroužkovců mají vylučovací orgány vytvořené ze shluku zvláštních plaménkových buněk – solenocytů. V některých tělních člancích slouží metanefridia částečně, nebo zcela jako pohlavní vývody – gonodukty.

Nervová soustava je tvořena velkým párovitým nadhltanovým gangliem a dále soustavou párovitých ganglií, umístěných v jednotlivých člancích pod trávicím traktem. Ganglia jsou navzájem spojena komisurami a konektivy a vybíhají z nich nervy do dalších částí těla. Ze smyslových orgánů se u kroužkovců vyskytují hlavně chemoreceptory, taktilní smyslové orgány, statocysty a jednoduché oči.

Kroužkovci jsou převážně hermafroditi. U mořských se vyskytuje larva – obrvená plovoucí trochofora. U kroužkovců je časté nepohlavní paratomické a architomické dělení, běžná je regenerace. (Sedlák, E.; 2003)

#### Třída: *Polychaeta* (**Mnohoštětinatci**)

Většinou mořští živočichové mající na tělních člancích párovité výběžky – parapodia nesoucí svazečky štětín, smyslové výrůstky (cirri) a často také žábry. Larvou je typická trochofora. Třída je rozdělena na 17 – 23 řádů, které je možné uměle dělit dle způsobu života a charakteristických znaků do dvou výrazných skupin.

Skupina řádů, označovaná jako „erantní mnohoštětinatci“, zahrnuje volně žijící dravé druhy s dobře vyvinutým prostomiem nesoucím tykadla a oči, s výraznými kutikulárními kusadly v ústech a parapodiemi ve funkci pohybových orgánů.

Tzv. „sedentární mnohoštětinatci“ zahrnují málo pohyblivé druhy žijící v chodbičkách v bahně nebo ve vyloučených vápenitých či organických rourkách. Jejich parapodia jsou přeměněná v přichycovací orgány nebo v žábry. Na přídi mají často tykadlovité výrůstky k zachycování mikroskopické potravy. Jiné druhy, žijící v chodbičkách v bahně, se živí organickými částicemi z tohoto substrátu. (Sedlák, E.; 2003)

**Podtřída: *Oligochaeta (Máloštětinatci)***

Máloštětinatci mají stejnocennou, tj. homonomní segmentaci těla, počet článků je různý. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Na tělních člancích jsou obvykle nespočetné štětiny ve čtyřech svazečcích. Opasek se vytváří v dospělosti a přetrvává i nadále. Mesenteria nemusí být zcela vytvořena, takže v každém článku je potom pouze jeden coelomový váček.

Trávicí soustava může být diferencovaná na ústa, hltan, jícen, žláznatý žaludek, žvýkací žaludek, střevo a řitní otvor. Pro cévní soustavu je typická přítomnost tzv. pomocných (auxilárních) srdcí vytvořených z obloukovitých postranních cév v přední části těla.

Máloštětinatci jsou většinou hermafroditi.

Z našeho území je udáváno přes 170 druhů. (Sedlák, E.; 2003)

Dle výskytu v přírodě lze rozlišit dvě skupiny máloštětinatců: druhy žijící na rostlinách a živící se nárosty a druhy žijící na povrchu dna a v bahně. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

**Řád: *Plesiopora (Nítěnkovci)***

Mají jeden pár testes s vývody v následujícím článku a jeden pár ovárií. Tělo je tenké, malých rozměrů. Častá je architomie a paratomie.

**Druh: *Tubifex tubifex (Nítěnka obecná)***

Nítěnka obecná žije v bahně pomalu tekoucích vod, kde může snášet i značný kyslíkový deficit. Její před' je zasunutá do substrátu, tělo nad dnem je částečně ukryté v bahnitě trubičce, volná zád' vykonává vlnivé dýchací pohyby. (Sedlák, E.; 2003)

Tělo je červené až hnědé, delší než 2 cm. (Říhová Ambrožová, J.; 2007)

Je to běžné krmivo pro akvarijní ryby.



*Tubifex tubifex* - nítěnka obecná (foto: Antoušek, Ivo: BioLib.cz, 2005)

### **3. Experimentální část**

### **3.1. Testované organismy**

#### **Cysty žábřonožky solné *Artemia salina*, L.**

Cysty, které pro experimenty používáme, dodává na náš trh německá firma JBL (*Novo-Temia, Artemia Eggs*). Líhňivost cyst je dodavatelem garantována po dobu dvou let.

Můžeme je zakoupit v běžných akvaristických obchodech. Jsou prodávány v neprodyšných sáčkích nebo konzervách. Po otevření musíme zajistit uchování bez přístupu vzdušné vlhkosti a světla.

Vajíčka uchováváme v lednici při 5°C. Uzavřeme je do skleněné lahve, kterou umístíme do exsikátoru. Jako hygroskopickou náplň v tomto případě použijeme oxid fosforečný (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

#### **Cysty vířníka *Brachionus calyciflorus***

Cysty jsou součástí balení Rotoxkitu F a Rotoxkitu F Chronic, které dodává belgický výrobce MicroBioTests Inc.

Malé plastové nádobky s cystami *Brachionus calyciflorus* uchováváme v chladu a temnu při 5°C k zajištění maximální líhňivosti.

#### **Semena hořčice bílé *Sinapis alba***

Testovacím organismem jsou semena hořčice bílé s klíčivostí minimálně 90 %, střední velikosti (1,5 – 2,5 mm), okrově žlutá.

Semena, která pro experimenty používáme, jsou zakoupeny od firmy OSEVA UNI, a.s. (*Hořčice bílá Zlata, generace C1*) zabývající se prodejem osiv zemědělcům.

Semena uchováváme v suchu a temnu při 20°C. Po otevření musíme zajistit uchování bez přístupu vlhkosti a světla.

### **Nítěnka obecná *Tubifex tubifex***

Testovacím organismem je nítěnka obecná *Tubifex tubifex* o přibližné velikosti nejlépe 10 – 20 milimetrů.

Živočichy, které při testech používáme, zakoupíme v potřebách pro akvaristy, kde jsou k dostání jako běžné krmivo pro rybičky.

Skladujeme je v provzdušňovaném akváriu s 8 cm sladké vody o pH  $7,5 \pm 0,1$  a 6 cm silnou vrstvou písku při teplotě  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , kdy se jim nejlépe daří. Zachováváme světelný režim den: noc 10:14 hodin. Krmíme je pivovarskými kvasnicemi.

## **3.2. Chemikálie, pomůcky a zařízení**

### **3.2.1. Použité chemické látky**

#### **3.2.1.1. Použitá léčiva**

***Augmentin<sup>®</sup> 625 mg*** - držitel rozhodnutí o registraci: Smithkline Beecham Pharmaceuticals, Brentford, Velká Británie

- balení: POR POR TBL FLM 21X625MG+SÁČEK
- ATC skupina: J01CR02
- účinná látka: Amoxicillinum trihydricum 574 mg (což odpovídá 500 mg amoxicilinu) a Kalii clavulanas 149 mg (což odpovídá 125 mg kyseliny klavulanové) v jedné tabletě
- pomocné látky: Magnesium-stearát, sodná sůl karboxymethylškrobu, koloidní oxid křemičitý, mikrokrystalická celulóza, oxid titaničitý, hypromelosa 2910/5, hypromelosa 2910/15, makrogol 4000, makrogol 6000, dimetikon
- léková forma: Potahovaná tableta
- kód SÚKL: 86148
- registrační číslo: 15/141/84-C

***Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml*** - držitel rozhodnutí o registraci: Sandoz GMBH, Kundl, Rakousko

- balení: POR POR GRA SUS 1X60ML
- ATC skupina: J01CA04
- účinná látka: Amoxicillinum trihydricum 430,5 mg (což odpovídá 375 mg amoxicilinu) v 5 ml (1 odměrce) suspenze

- pomocné látky: Benzoan sodný, dihydrát sodné soli sacharinu, simetikon, citronan sodný, galaktomanan guar, aroma mučenkové, malinové a jahodové.

- léková forma: Zrněný prášek pro přípravu perorální suspenze

- kód SÚKL: 66367

- registrační číslo: 15/731/94-C

### 3.2.1.2. Standardy účinné látky

*Amoxicillin T trihydrate VETRANAL<sup>®</sup>, analytical standard 0,5 g*

- vzorec:  $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$

- molární hmotnost:  $419,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

- výrobce: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

*Amoxicillin SIGMA<sup>®</sup> 1 g*

- vzorec:  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$

- molární hmotnost:  $365,40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

- výrobce: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

### 3.2.1.3. Ostatní chemikálie

Voda získaná reverzní osmózou

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Chlorid sodný (NaCl)

Chlorid hořečnatý ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )

Síran sodný ( $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ )



Chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ )

Chlorid draselný ( $\text{KCl}$ )

Chlorid manganatý ( $\text{MnCl}_2$ )

Kyselina chlorovodíkové ( $\text{HCl}$ )

Hydroxid sodný ( $\text{NaOH}$ )

Hydrogenuhličitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ )

Síran vápenatý ( $\text{CaSO}_4$ )

Síran hořečnatý ( $\text{MgSO}_4$ )

Dichroman draselný ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )

### **3.2.2. Pomůcky a přístroje**

#### ***Pomůcky***

Plastové testovací destičky s 96 a 24 jamkami

ROTOXKIT F<sup>TM</sup>

ROTOXKIT F<sup>TM</sup> CHRONIC

Petriho misky skleněné (o průměru 18, 10, 5 cm) a plastové (o průměru 9 cm)

Petriho misky plastové (o průměru 10 cm) s perforovanou přepážkou

Skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem

Zábrusové zkumavky skleněné s uzávěry

Zkumavky centrifugační

Automatické mikropipety a špičky firmy Bran (100 – 1 000  $\mu\text{l}$ , 20 – 200  $\mu\text{l}$ , 0,5 – 5 ml)

Stojany na zkumavky

Pipety skleněné

Pipety plastové malé

Erlenmayerovy baňky

Laboratorní lžičky

Váženky

Entomologické pinzety

Teploměr

Skleněné tyčinky

Kádinky

Odměrné baňky

Filtrační papíry

Teflonové míchadlo

Ochranné rukavice

Parafilmy

Eksikátor

Roušky

Lihové fixy na popisování

Černé papíry

### ***Přístroje***

Předvážky Kern 440-47N

Analytické váhy Kern Abj

pHmetr pH/Cond 340

Oxymetr Oxi340i

Míchačka MM2A (Laboratorní přístroje Praha)

Termostat VTB Binder

Termostat MicroBioTest Inc.

Ultrazvuková lázeň Bandeln

UV lampa DDHN 16 330 (345/245 nm)

Stereomikroskop

Přístroj na reverzní osmózu Water Purification System

Lampa se 100W žárovkou

Lednice

### **3.3. Provedení experimentu**

#### **3.3.1. Příprava a provedení experimentu pomocí *Artemia salina*, L.**

Krátkodobé testy s *A. salina* pro stanovení parametrů toxicity chemických látek jsou využívány v mnoha laboratořích po celém světě. Bylo vypracováno několik metodik pro samotné provedení testu.

Při vlastním testování jsme vycházeli z postupů navržených skupinou Paula Vanhaecke. (Vanhaecke a kol.; 1981)

#### **Příprava mořské vody**

Standardní uměle vytvořená mořská voda používaná pro líhnutí cyst a pro samotný experiment má obvykle salinitu  $35 \pm 1$  ‰. (Vanhaecke a kol.; 1981)

Pro její přípravu použijeme směs solí.

Složení (na 1000 ml): chlorid sodný (NaCl)	23,00 g
chlorid hořečnatý ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	11,00 g
síran sodný ( $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ )	9,07 g
chlorid vápenatý ( $CaCl_2$ )	2,11 g
chlorid draselný (KCl)	0,70 g
destilovaná voda	do 1000 ml

Po navážení všech součástí umístíme vodu ve skleněné lahvi se šroubovacím uzávěrem na míchačku a tam pomocí teflonového míchadla zajistíme šetrné míchání až do rozpuštění všech komponent roztoku.

Po rozpuštění všech solí se pH vody pohybuje okolo  $8 \pm 0,2$ . Pokud se naměřená hodnota pH liší, tak ji upravíme pomocí roztoku hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové. Před použitím vody pro vlastní pokus ji můžeme zfiltrvat kvůli odstranění případných mechanických nečistot.

Množství rozpuštěného kyslíku by nemělo klesnout pod 90 %.

### **Příprava testovacího organismu *Artemia salina*, L.**

Pro každý test použijeme 0,5 g cyst a na jejich líhnutí 25 ml uměle připravené mořské vody. Vajíčka navážená do Petriho misky smáčíme 3 ml připravené mořské vody.

Po 5 minutách opatrně přidáme zbývajících 22 ml mořské vody. Víčkem uzavřenou Petriho misku s vajíčky umístíme asi 30 cm od lampy se 100W žárovkou. V této vzdálenosti se teplota pohybuje mezi 25 a 30°C.

Po jedné hodině zahřívání misku s vajíčky přemístíme do inkubátoru. Tady za nepřítomnosti světla a při konstantní teplotě 25°C zůstávají 24 hodin.

Druhý den polovinu Petriho misky zakryjeme materiálem nepropouštějícím světlo (např. černým papírem) a misku znovu umístíme 30 cm od lampy se 100W žárovkou. Díky fototaxi se žábřonožky nahromadí na nezakryté straně Petriho misky.

Přibližně po 30 minutách odstraníme z hladiny filtračním papírem skořápky. Z osvětlené strany misky pomocí mikropipety postupně odebíráme nauplia do druhé plastové Petriho misky s dělicí příčkou, ve které je asi 10 ml připravené mořské vody.

Část plastové Petriho misky, do které umístíme nauplia, je zakryta neprůsvitným materiálem. Celou misku přesuneme na 30 minut znovu pod lampu se 100W žárovkou.

Po té době přeneseme asi 20 ml suspenze nauplií ze strany, která nebyla zakryta, do lahve s 25 ml připravené mořské vody. Z této lahve potom žábřonožky odebíráme pro vlastní pokus.

### **Příprava testované látky**

Testovanou látku, kromě standardního toxinu (chlorid manganatý,  $\text{MnCl}_2$ ), testujeme v milimolárních koncentracích. Množství látky, které odpovídá nejvyšší koncentraci, navážíme a rozpustíme v zábrusové zkumavce. Jako rozpouštědlo použijeme připravenou mořskou vodu o  $\text{pH } 8,0 \pm 0,2$ . Pro dokonalé rozpuštění použijeme ultrazvukovou lázeň či DMSO.

Koncentrační řadu připravíme ředěním vzorku s nejvyšší koncentrací.

## Vlastní provedení pokusu

Vychází z metodiky, kterou navrhl Paul Vanhaecke a kol.

Pokusy provádíme v plastových 96-jamkových testovacích destičkách (viz nákres). Každá destička má 8 řad (A-H) a 12 sloupců (1-12). Sloupce odpovídají jednotlivým koncentracím a řady opakování jedné koncentrace. V každém sloupci vyhradíme jednu jamku pro kontrolu pokusu (tj. řada A).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Do každé jamky umístíme 100  $\mu$ l vzorku. Po lehkém protřepání do každé jamky přidáme 50  $\mu$ l suspenze nauplií (asi 10 – 20 jedinců).

Při každém pokusu provedeme paralelní test se standardním toxinem (chlorid manganatý,  $MnCl_2$ ).

Nakonec přikryté desky přemístíme na dalších 24 hodin do inkubátoru s konstantní teplotou 25°C. Jednu destičku necháme v inkubátoru ozařovat 30 minut pod konstantním UV zářením 365 nm pro zjištění možné fototoxicity.

Po 24 hodinách pomocí stereomikroskopu spočítáme uhynulé jedince. Žijící larvy usmrtíme pomocí 50  $\mu$ l 0,1M roztoku kyseliny chlorovodíkové. Nakonec odečteme všechny jamky ještě jednou.

## Vyhodnocení výsledků

Získaná data můžeme hodnotit, pokud úmrtnost v kontrolách nepřesáhne 5 %.

$EC_{50}$  spočítáme pomocí programu Prisma nelineární regresí.

### **3.3.2. Příprava a provedení experimentu pomocí *Brachionus calyciflorus***

Vířníci, pod jejichž kmen tento organismus zařazujeme, jsou častým zkušebním materiálem v ekotoxikologických testech.

Bylo vypracováno několik metodik pro samotné provedení testu. (např. Snell, T. W. a kol.; 1992)

Při vlastním testování jsme vycházeli ze standardních operačních postupů přiložených k ROTOXKITU F (screeningový test toxicity vířníků pro sladkovodní prostředí) a ROTOXKITU F CHRONIC (chronický test toxicity pro sladkovodní prostředí).

#### **3.3.2.1. Kity**

Od belgického výrobce MicroBioTests Inc. získáme kity ROTOXKIT F a ROTOXKIT F CHRONIC, které obsahují všechny komponenty k jednotlivým testům, tj. testovací destičky, koncentrované solné roztoky ( $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , KCl), krmivo (v případě chronického testu) obsahující zelené řasy a tzv. Roti-Rich pudr, dále cysty testovacího organismu *Brachionus calyciflorus* a pomocný materiál (mikropipety, Lugolův roztok, pásy Parafilmu).

#### ***Skladování krmiva a ostatních složek kitů***

Zkumavky obsahující řasové kuličky (zelená řasa *Selenastrum capricornutum* imobilizovaná v inertní matrix) ve vyživovacím médiu musíme též uchovávat v temnu při 4°C.

Ostatní komponenty kitů (kromě cyst vířníků, viz kapitola 3.1.) uchováváme v suchu a temnu při 20°C.

#### **3.3.2.2. Příprava a provedení experimentu na akutní toxicitu vířníků s pomocí Rotoxkitu F**

##### ***Příprava standardního sladkovodního roztoku***

Standardní sladkovodní roztok používáme jako médium určené k líhnutí cyst a jako ředící médium pro přípravu roztoků.

Do litrové odměrné baňky nalijeme 800 ml destilované vody. Postupně přidáváme koncentrované solné roztoky hydrogenuhličitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ ), dva síranu vápenatého ( $\text{CaSO}_4$ ), síranu hořečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ), chloridu draselného ( $\text{KCl}$ ). Poté doplníme destilovanou vodou po rysku.

Roztok musíme vždy před začátkem pokusu minimálně 15 minut provzdušňovat.

### ***Líhnutí cyst***

Líhnutí je nutné započít 24 hodin před samotným testem.

Do Petriho misky o průměru 5 centimetrů nebo do líhnoucí jamky přidáme 2 ml média. Ze zkumavky k tomu určené přeneseme cysty vířníka. Zkumavku nakonec ještě vypláchneme 0,5 ml média, aby došlo k dokonalému přenesení cyst.

Takto připravenou misku překryjeme Parafilmem a necháme v inkubátoru líhnout nejméně 16 – 18 hodin (při opožděném líhnutí se perioda prodlužuje a je nutná kontrola každou hodinu) při teplotě  $25^\circ\text{C}$  a kontinuálním osvětlení 3 000 – 4 000 lux.

Po vylíhnutí pro lepší manipulaci s organismem opatrně pomocí filtračního papíru odstraníme skořápky.

### ***Příprava testované látky***

Testovanou látku testujeme v milimolárních koncentracích. Množství látky, které odpovídá nejvyšší koncentraci, navážíme a rozpustíme v zábrusové zkumavce. Jako médium použijeme 100% DMSO, aby došlo k úplnému rozpuštění látky a případná suspenze nerušila konečné odečítání výsledků. Tento roztok poté vlijeme do zkumavky s připraveným sladkovodním roztokem tak, aby množství DMSO v konečném roztoku bylo 0,5 %.

Koncentrační řadu připravíme ředěním vzorku s nejvyšší koncentrací. Používáme hrubší ředění 0,5.

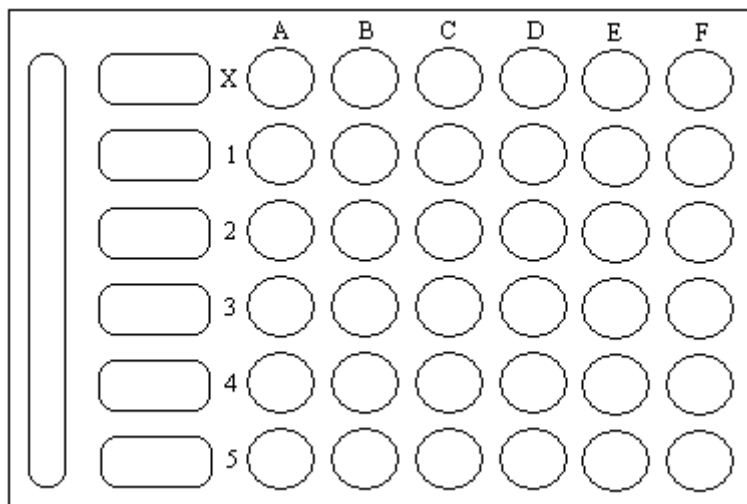
Standardní toxin dichroman draselný ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) rozpouštíme též v připraveném sladkovodním roztoku.

### ***Vlastní provedení pokusu***

Pokusy provádíme v plastových 43-jamkových testovacích destičkách (viz nákres). Každá destička má zleva jednu líhnoucí jamku (pro lepší manipulaci raději používáme skleněnou pěticentimetrovou Petriho misku), 6 podlouhlých promývacích



jamek a 36 testovacích jamek. Řada X je kontrola pouze s médiem, řady (1-5) odpovídají jednotlivým koncentracím a sloupce (A-F) opakování jedné koncentrace.



Do promývacích jamek umístíme 700  $\mu$ l roztoku s testovanou látkou a do testovacích 300  $\mu$ l. Řady plníme tak, že nejnižší koncentrace je v 1. řadě a nejvyšší v 5.

Pod stereomikroskopem přidáváme z Petriho misky pomocí speciální polyetylenové mikropipety vířníky nejprve do promývacích jamek tak, aby došlo k co možná nejnižšímu rozředění roztoku. V každé promývací jamce by mělo být asi 60 jedinců. Z této jamky přeneseme 5 jedinců do ostatních jamek v řadě.

Nakonec destičky překryjeme Parafilmem a dáme do inkubátoru při teplotě 25°C na 24 hodin. Jednu destičku necháme v inkubátoru ozařovat 30 minut pod konstantním UV zářením 365 nm pro zjištění možné fototoxicity.

Po 24 hodinách pomocí stereomikroskopu spočítáme uhynulé jedince v jednotlivých testovacích jamkách.

Pro zajištění kontroly správnosti testu a dobrého fyziologického stavu testovaných zvířat musíme vykonat paralelní test s dichromanem draselným ( $K_2Cr_2O_7$ ).

### ***Vyhodnocení výsledků***

Získaná data můžeme hodnotit, pokud úmrtnost v kontrolách nepřesáhne 10 %.

$EC_{50}$  získáme pomocí programu Prisma nelineární regresí.

### **3.3.2.3. Příprava a provedení experimentu na zjištění chronické toxicity vířníků s pomocí Rotoxkitu F Chronic**

#### ***Příprava standardního sladkovodního roztoku***

Platí totéž jako v předchozím testu akutní toxicity na vířnících – Rotoxkit F.

#### ***Líhnutí cyst***

Líhnutí má stejný průběh jako u testů s Rotoxkitem F s tím rozdílem, že do líhnoucí jamky nebo Petriho misky přidáváme pouze 1,5 ml média, do kterého následně umístíme cysty.

#### ***Příprava testované látky***

Postupujeme stejně jako u testu na akutní toxicitu vířníků.

#### ***Příprava koncentrované suspenze krmiv***

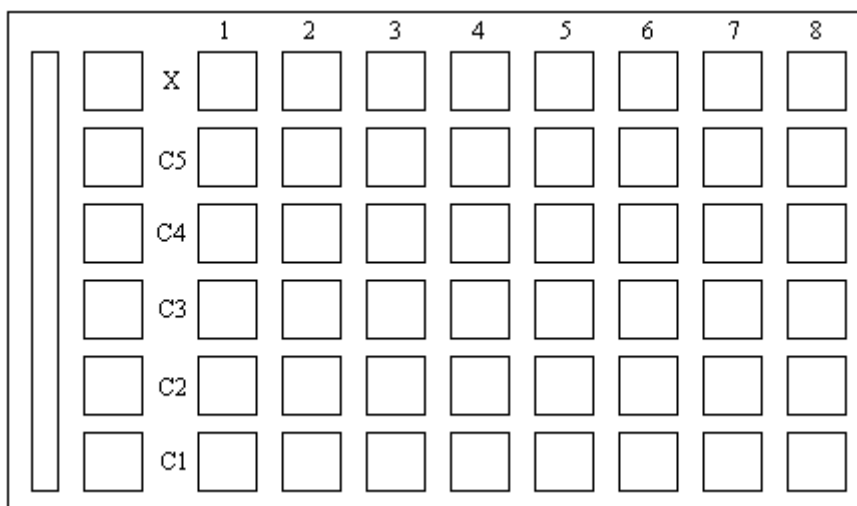
Z centrifugační zkumavky obsahující řasové kuličky vylijeme tekutinu a přidáme 4 ml rozpouštěcího média (Matrix dissolving medium). Po uzavření zkumavky rázně protřepáváme každé 2 minuty po dobu 10-15 minut. Po protřepání ji centrifugujeme 10 minut při 3 tisících otáčkách. Ze zkumavky vylijeme supernatant a přidáme 10 ml neionizované vody, opět zavřeme a resuspendujeme obsah. Po dalším centrifugování za stejných podmínek slijeme supernatant. Přidáme 1,8 ml kultivačního média pro řasy, uzavřeme a protřepáváme do resuspendování řas. Kultura obsahuje  $2 \cdot 10^8$  řasových buněk/ml.

#### ***Vlastní provedení pokusu***

Před vlastním provedením pokusu musíme čerstvě vylíhnuté vířníky nakrmit krmivem Roti-Rich. Vezmeme jednu tubu krmiva a přidáme 1 ml standardního sladkovodního roztoku a zhomogenizujeme. Pomocí mikropipety přidáme k vířníkům do Petriho misky pět kapek takto připraveného krmiva 2 hodiny před začátkem testu.

Do každé ze zkumavek tvořících koncentrační řadu roztoků dáme 100  $\mu$ l řasového suspenzního krmiva.

Pokusy provádíme v plastových 55-jamkových testovacích destičkách (viz nákres). Každá destička má zleva jednu líhnoucí jamku, 6 promývacích jamek a 48 testovacích jamek. Řada X slouží jako kontrola a řady (c<sub>1</sub>-c<sub>5</sub>) odpovídají jednotlivým koncentracím a sloupce (1-8) opakování jedné koncentrace.



Do promývacích a testovacích jamek umístíme 1 000 µl roztoku s testovanou látkou. Řady plníme tak, že nejnižší koncentrace je v 1. řadě a nejvyšší v 5.

Pod stereomikroskopem přidáváme z Petriho misky pomocí speciální polyethylenové mikropipety vířníky nejprve do promývacích jamek tak, aby došlo k co možná nejnižšímu rozředění roztoku. V každé promývací jamce by mělo být asi 10 – 15 aktivně se pohybujících jedinců. Z této jamky přeneseme 1 vířníka do ostatních jamek v řadě.

Nakonec destičky překryjeme Parafilmem a dáme do inkubátoru při konstantní teplotě 25°C na 48 hodin. Jednu destičku necháme v inkubátoru ozařovat 30 minut pod konstantním UV zářením 365 nm pro zjištění možné fototoxicity.

Po 48 hodinách pomocí stereomikroskopu spočítáme uhynulé, popř. nově narozené jedince v jednotlivých testovacích jamkách. Pro usnadnění počítání můžeme jedince zafixovat Lugolovým roztokem.

Pro zajištění validity testu musíme vykonat paralelní test s dichromanem draselným ( $K_2Cr_2O_7$ ).

### ***Vyhodnocení výsledků***

Pokud mortalita v kontrole přesáhne 10 %, musíme test zopakovat.

Pomocí programu Prisma zjistíme nelineární regresí  $EC_{50}$ .

### **3.3.3. Příprava a provedení experimentu pomocí semen *Sinapis alba*, L.**

Test byl vyvinut k testování neškodnosti odpadních vod, jež by mohly být použity pro závlahy např. zemědělských plodin. Testuje se vliv vody na klíčení semen a růst kořenů hořčice bílé *Sinapis alba* v počátečních stádiích vývoje. Test spočívá v kultivaci semen na podložkách nasycených roztoky zkoumané látky ve srovnání se semeny, které rostou na podložce nasycené vodou. V testech toxicity představuje hořčice zástupce kulturních plodin a vyšších rostlin vůbec.

#### **Příprava testované látky**

Testovanou látku i standardní toxin (dichroman draselný,  $K_2Cr_2O_7$ ) testujeme v milimolárních koncentracích. Množství látky, které odpovídá nejvyšší koncentraci, navážíme a rozpustíme v zábrusové zkumavce. Jako rozpouštědlo použijeme vodu získanou reversní osmózou. Pro dokonalé rozpuštění použijeme ultrazvukovou lázeň či použijeme DMSO.

Koncentrační řadu připravíme ředěním vzorku s nejvyšší koncentrací. Faktor ředění pro testovanou látku je 2 a pro standardní toxin 1,5.

#### **Vlastní provedení pokusu**

Vychází z Metodického pokynu odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů.

Pokusy provádíme v plastových Petriho miskách o průměru 90 mm. Pro každé ředění použijeme tři Petriho misky a další tři použijeme pro kontrolu pokusu (tj. kultivační roztok zásobních solí, my jen destilovanou vodu).

Na dno Petriho misek položíme vystřižený filtrační papír větší pórovitosti tak, aby pokryl celé dno misky. Ten pak nasytíme 5 ml testovaného roztoku tak, aby se pod filtračním papírem netvořily bublinky vzduchu.

Na nasycené filtrační papíry rovnoměrně vložíme po 10 semenech.

Při každém pokusu provedeme paralelní test se standardním toxinem (dichroman draselný,  $K_2Cr_2O_7$ ) pro zajištění správnosti postupu a kvality semen.

Uzavřené Petriho misky vložíme na 72 hodin do termostatu s konstantní teplotou 20°C.

Po 72 hodinách přesně změříme milimetrovým měřítkem délku kořene každé rostliny u jednotlivých koncentrací.

### Vyhodnocení výsledků

Výsledky testů považujeme za platné, jestliže jsou splněny následující požadavky:

- klíčivost semen v kontrole je nejméně 90 %,
- stanovená hodnota  $IC_{50}$  standardu (dichroman draselný,  $K_2Cr_2O_7$ ) pro testovaná semena je v rozmezí 10-50  $ml.l^{-1}$ .

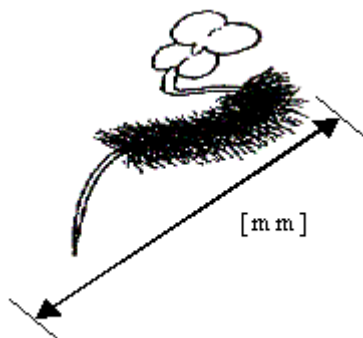
Na základě průměrných délek kořenů v jednotlivých koncentracích se spočítá inhibice růstu podle následujícího vzorce:

$$I = \frac{D(k) - D(t)}{D(k)} \cdot 100$$

I je inhibice růstu kořene (%)

D(k) je průměrná délka kořene v kontrole (mm)

D(t) je průměrná délka kořene v testované koncentraci (mm)



Hodnoty inhibice zakreslíme do grafu a určíme  $IC_{50}$ .

### **3.3.4. Příprava a provedení experimentu pomocí *Tubifex tubifex***

Experimentální metodika screeningového testování pomocí nítěnky obecné *Tubifex tubifex* je součástí navrženého a propracovávaného testu pracovní skupiny vedené mgr. Jitkou Vytlačilovou na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

Vychází ze zkušeností pracovníků a je navržena pro ověřování fotosenzibilizačních vlastností testovaných látek.

### **Příprava testovacího organismu *Tubifex tubifex***

Po zakoupení, případně vylovení z akvária, musíme nítěnky několikrát propláchnout destilovanou vodou, abychom odstranili nečistoty, které na nich ulpěly nebo zůstaly v roztoku.

Do Petriho misky o průměru 18 centimetrů vložíme očistěná zvířata spolu s vodou získanou reverzní osmózou tak, aby se nítěnky mohly volně pohybovat.

Misku s obsahem dáme do termostatu vytemperovaného na 20°C na 24 hodin, při nichž jsou nítěnky bez krmiva.

Před samotným pokusem a po vyndání z termostatu je musíme znovu propláchnout, abychom se zbavili produktů vylučování a případně nepřeživších organismů. Očistu provedeme i entomologickou pinzetou, aby čistota byla úplná.

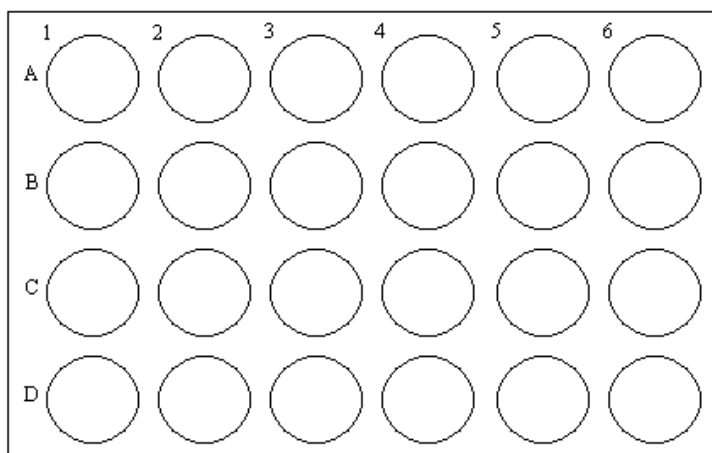
### **Příprava testované látky**

Testovanou látku včetně standardního toxinu (chlorid manganatý,  $MnCl_2$ ) testujeme v milimolárních množstvích. Množství látky, které odpovídá nejvyšší koncentraci, navážíme a rozpustíme v zábrusové zkumavce. Jako rozpouštědlo použijeme vodu získanou reverzní osmózou. Pro dokonalé rozpuštění můžeme použít ultrazvukovou lázeň (v případě léčiva) či rozpouštědlo DMSO (dimethylsulfoxid) – v případě standardu účinné látky (amoxicilin).

Koncentrační řadu připravíme ředěním vzorku s nejvyšší koncentrací. Používáme ředění 0,5 jak pro standardní toxin, tak pro testovanou látku.

### **Vlastní provedení pokusu**

Pokusy provádíme v plastových 24-jamkových testovacích destičkách (viz nákres). Každá destička má 4 řady (A-D) a 6 sloupců (1-6). Sloupce odpovídají jednotlivým koncentracím a řady opakování jedné koncentrace. V každém sloupci vyhradíme jednu jamku pro kontrolu pokusu.



Do každé jamky umístíme 480  $\mu\text{l}$  vody získané reverzní osmózou. Do vody vložíme entomologickou pinzetou 6 nítěnek přibližně stejné velikosti, které pak pod stereomikroskopem zkontrolujeme, zda nejsou poškozené. Poté přidáme ještě 500  $\mu\text{l}$  roztoku s účinnou látkou.

Při každém pokusu provedeme paralelní test se standardním toxinem (chlorid manganatý,  $\text{MnCl}_2$ ).

Přikryté desky umístíme do termostatu s konstantní teplotou  $20^\circ\text{C}$  na půl hodiny v případě testované látky a na jednu hodinu v případě standardního toxinu. Jednu destičku dáme pod UV lampu s konstantním osvětlením 365 nm pro zjištění případné fototoxicity rovněž na 30 minut s tím, že paprsky ultrafialového světla se nesmí dostat na neozařované destičky (neozařované destičky případně překryjeme tmavým papírem).

Po uplynutí potřebné doby pomocí stereomikroskopu spočítáme uhynulé, případně poškozené jedince.

### **Vyhodnocení výsledků**

Pomocí programu Prisma nelineární regresí spočítáme  $\text{EC}_{50}$ .

## **4. Výsledky**



## 4.1. *Artemia salina*, L.

### 4.1.1. **Augmentin® 625 mg** – efekt vlivu UVA (365 nm)

- délka testu: 24 hodin (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, působení UVA po dobu 120 minut

Tabulka výsledků č. 1:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)		Mortalita (%)	
		PS 1	PS 2
1	9,122	0	0
2	4,561	6	0
3	2,281	0	0
4	1,140	0	0
5	0,570	0	3
6	0,285	3	4
7	0,142	10	4
8	0,071	19	2
9	0,0356	28	3
10	0,0178	54	1
11	0,00891	63	8
12	0,00445	74	18
13	0,00223	75	38
14	0,00111	80	43
15	0,000557	72	32
16	0,000278	84	46
17	0,000139	94	45
18	0,0000696	92	37
19	0,0000348	87	42
20	0,0000174	83	28
21	0,00000870	71	40
22	0,00000435	82	27
23	0,00000217	85	38
24	0,00000109	82	45

Tabulka výsledků č. 2:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)
	PS 3
11,996	17
5,998	2
2,999	1
1,499	1
0,750	1
0,375	0
0,187	1
0,0937	2
0,0469	12
0,0234	5
0,0117	2
0,00586	4
0,00293	6
0,00146	7
0,000732	13
0,000366	27
0,000183	10
0,0000915	22
0,0000458	14
0,0000229	16
0,0000114	18
0,00000572	19
0,00000286	7
0,00000143	13

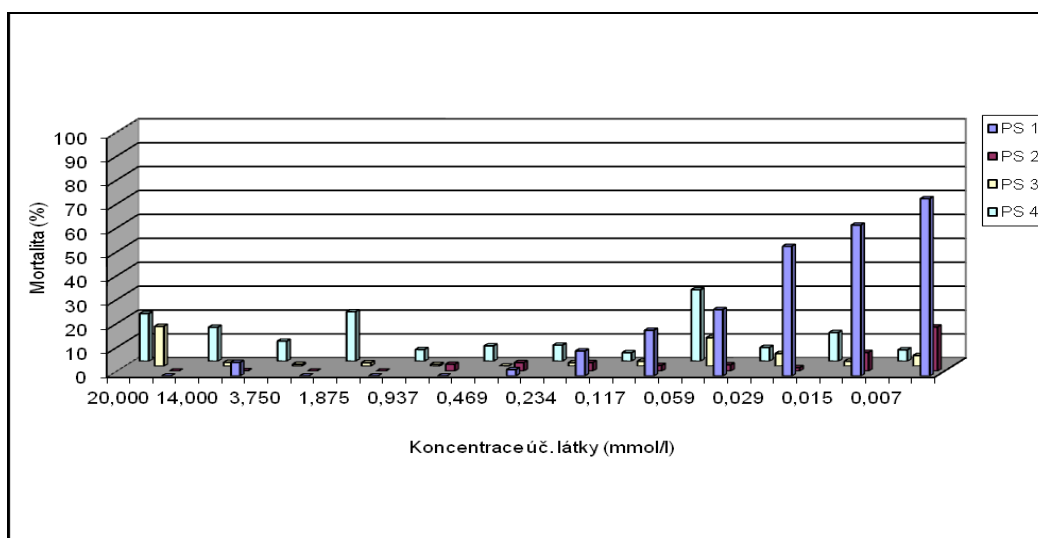
PS 1 – 3 .... paralelní stanovení č. 1 - 3

Tabulka výsledků č. 3:

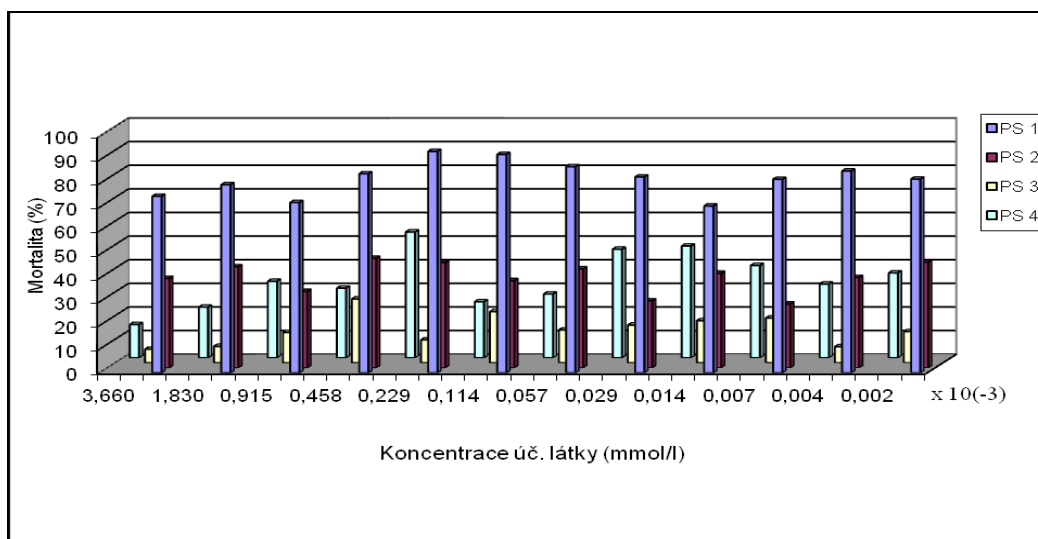
Koncentrace účinné látky (mmol/l)		Mortalita (%)
		PS 4
1	15	20
2	7,5	14
3	3,75	8
4	1,875	21
5	0,937	5
6	0,469	6
7	0,234	7
8	0,117	4
9	0,0586	30
10	0,0293	6
11	0,0146	12
12	0,00732	5
13	0,00366	14
14	0,00183	21
15	0,000915	32
16	0,000458	29
17	0,000229	53
18	0,000114	24
19	0,0000572	27
20	0,0000286	46
21	0,0000143	47
22	0,00000715	39
23	0,00000357	31
24	0,00000179	36

PS 4 .... paralelní stanovení č. 4

Graf č. 1: *Artemia salina* a Augmentin® 625 mg - efekt vlivu UVA (365 nm) (koncentrace účinné látky 1-12)



Graf č. 2: *Artemia salina* a Augmentin® 625 mg - efekt vlivu UVA (365 nm) (koncentrace účinné látky 13-24)



Augmentin® 625 mg v rozsahu testovaných koncentrací způsoboval úmrtnost, která nebyla způsobena léčivem, nýbrž pravděpodobně samotným experimentem, to mimo jiné vyplývá i z nerovnoměrné úmrtnosti v testovaných koncentracích. Je pravděpodobné, že působí ve vyšších koncentracích na organismy protektivně.

EC<sub>50</sub> standardního toxinu chloridu manganatého (MnCl<sub>2</sub>) byla 0,0142 mmol/l.

#### 4.1.2. **Augmentin® 625 mg - temnostní kontrola**

- délka testu: 24 hodin (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 4:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)		Mortalita (%)	
		PS 1	PS 2
1	9,122	1	0
2	4,561	6	0
3	2,281	1	0
4	1,140	1	3
5	0,570	1	7
6	0,285	18	0
7	0,142	4	0
8	0,071	45	0
9	0,0356	41	5
10	0,0178	59	0
11	0,00891	63	19
12	0,00445	84	23
13	0,00223	82	63
14	0,00111	81	38
15	0,000557	83	46
16	0,000278	82	52
17	0,000139	87	54
18	0,0000696	89	66
19	0,0000348	92	50
20	0,0000174	90	41
21	0,00000870	88	45
22	0,00000435	96	22
23	0,00000217	92	50
24	0,00000109	84	29

Tabulka výsledků č. 5:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)
	PS 3
11,996	14
5,998	2
2,999	1
1,499	0
0,750	1
0,375	3
0,187	3
0,0937	0
0,0469	10
0,0234	1
0,0117	13
0,00586	25
0,00293	29
0,00146	31
0,000732	33
0,000366	39
0,000183	21
0,0000915	44
0,0000458	23
0,0000229	40
0,0000114	26
0,00000572	35
0,00000286	24
0,00000143	32

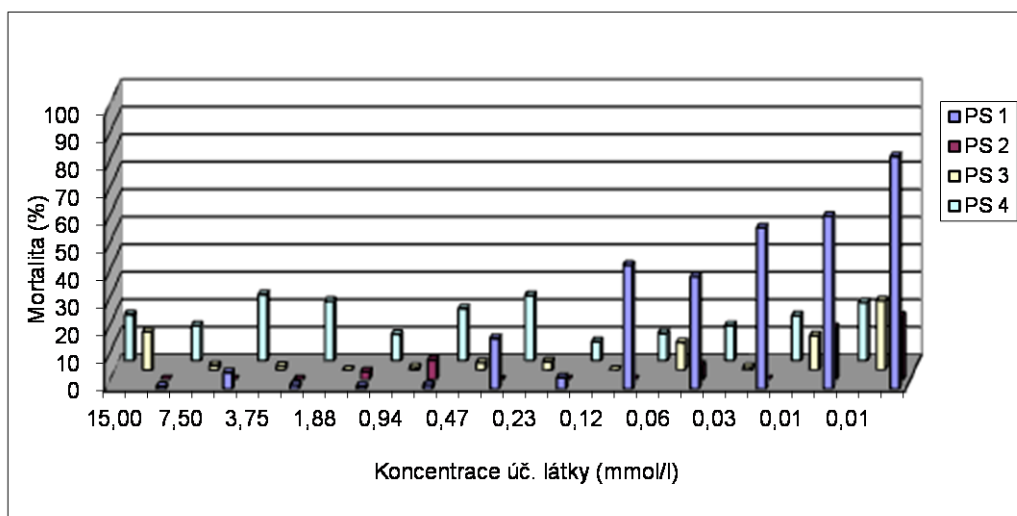
PS 1 – 3 ..... paralelní stanovení č. 1 - 3

Tabulka výsledků č. 6:

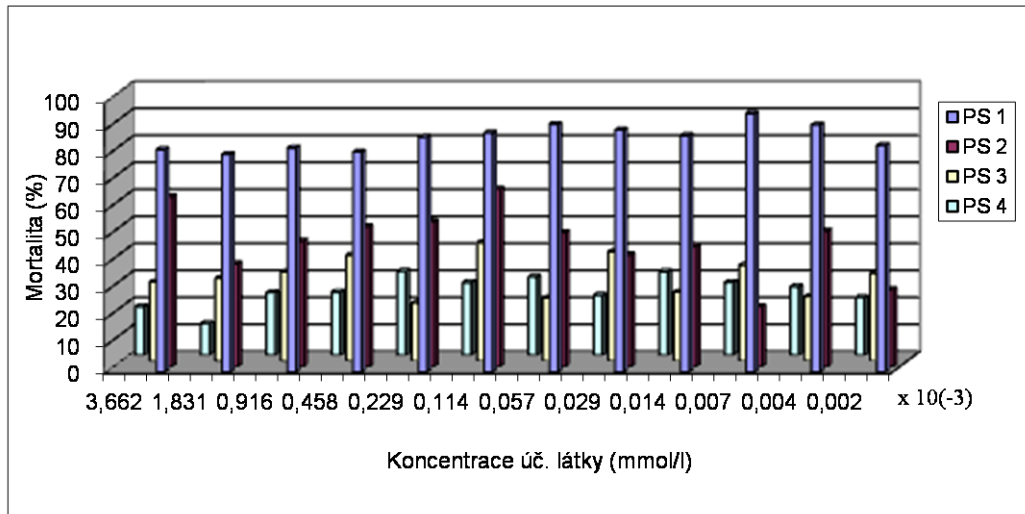
Koncentrace účinné látky (mmol/l)		Mortalita (%)
		PS 4
1	15	17
2	7,5	13
3	3,75	24
4	1,875	22
5	0,937	10
6	0,469	19
7	0,234	24
8	0,117	7
9	0,0586	10
10	0,0293	13
11	0,0146	16
12	0,00732	21
13	0,00366	18
14	0,00183	12
15	0,000915	23
16	0,000458	23
17	0,000229	31
18	0,000114	27
19	0,0000572	29
20	0,0000286	22
21	0,0000143	31
22	0,00000715	27
23	0,00000357	25
24	0,00000179	21

PS 4 ..... paralelní stanovení č. 4

Graf č. 3: *Artemia salina* a Augmentin® 625 mg – temnostní kontrola (koncentrace účinné látky 1-12)



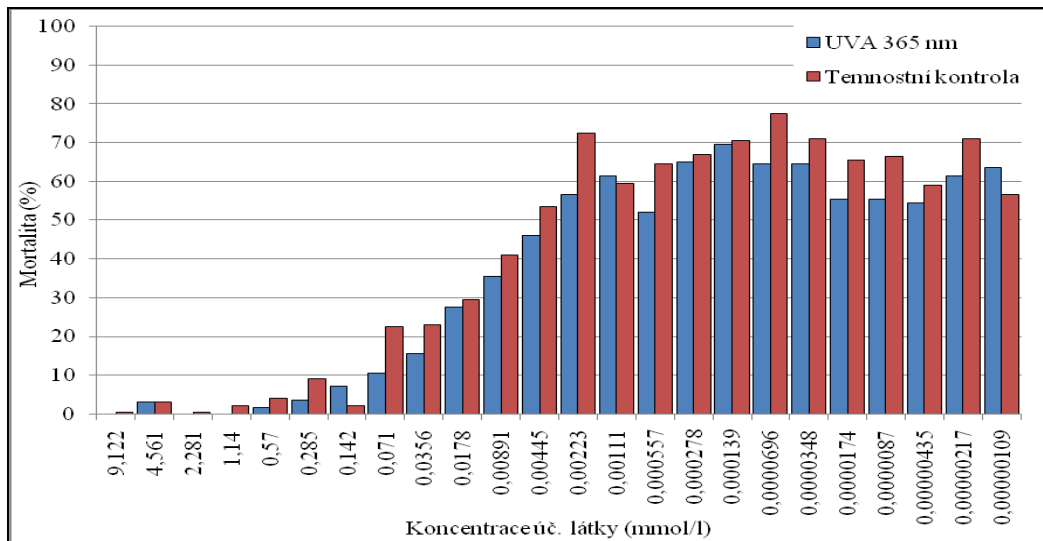
Graf č. 4: *Artemia salina* a Augmentin® 625 mg – temnostní kontrola (koncentrace účinné látky 13-14)



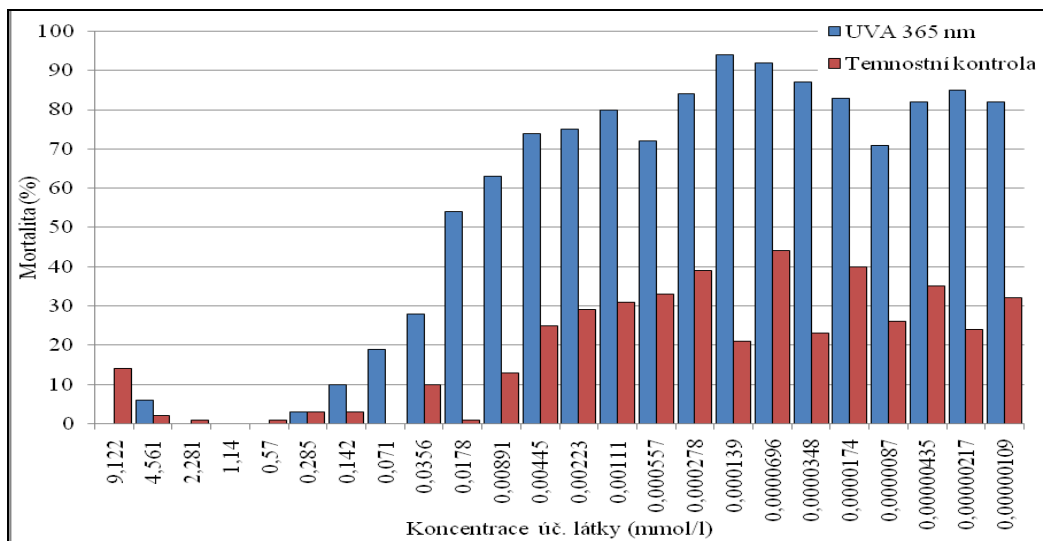
Augmentin® 625 mg v rozsahu testovaných koncentrací způsoboval úmrtnost, která nebyla způsobena léčivem, nýbrž pravděpodobně samotným experimentem, to mimo jiné vyplývá i z nerovnoměrné úmrtnosti v testovaných koncentracích. Je pravděpodobné, že působí ve vyšších koncentracích na organismy protektivně.

EC<sub>50</sub> standardního toxinu chloridu manganatého (MnCl<sub>2</sub>) byla 0,0142 mmol/l.

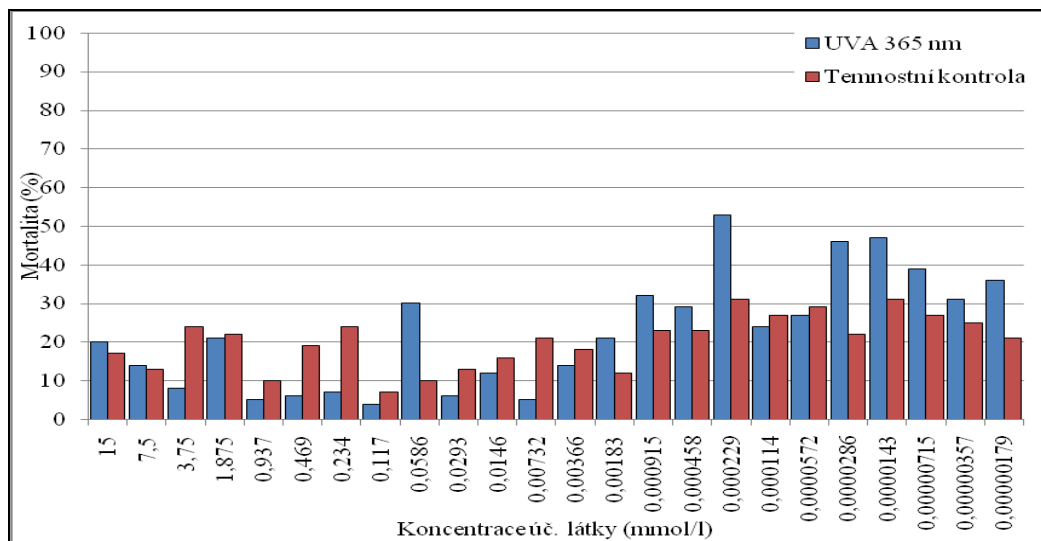
Graf č. 5: Porovnání hodnot mortality z tabulek výsledků č. 1 a 4 - *Artemia salina* a Augmentin® 625 mg



Graf č. 6: Porovnání hodnot mortality z tabulek výsledků č. 2 a 5 - *Artemia salina* a Augmentin® 625 mg



Graf č. 7: Porovnání hodnot mortality z tabulek výsledků č. 3 a 6 - *Artemia salina* a Augmentin® 625 mg



Ze získaných hodnot, které nevykazovaly žádnou pravidelnost, nebylo možné určit, zda je Augmentin® 625 mg pro *A. salina* fototoxický, či není.



#### 4.1.3. **Standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)**

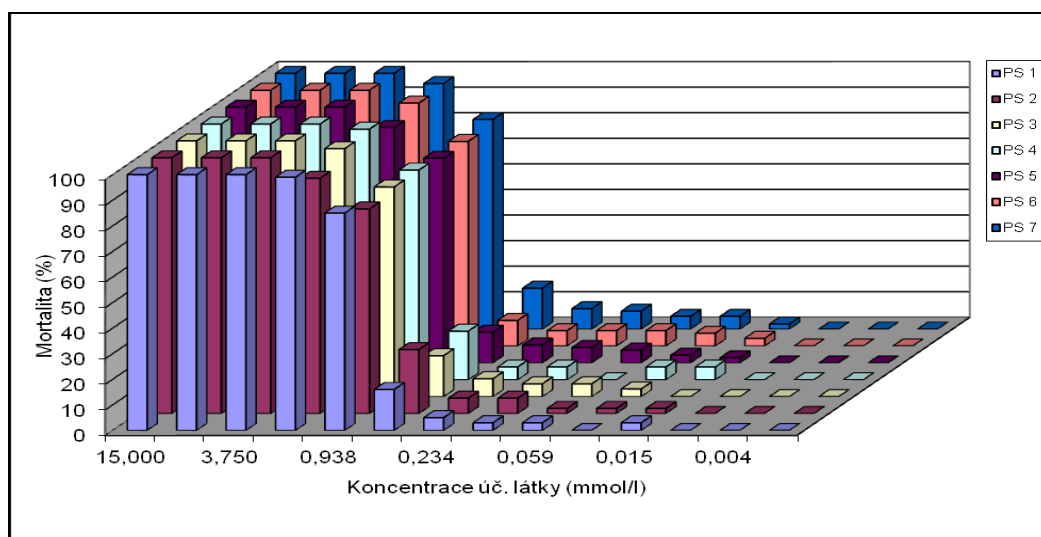
- délka testu: 24 hodin (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, působení UVA po dobu 120 minut

Tabulka výsledků č. 7:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)							
	PS 1	PS 2	PS 3	PS 4	PS 5	PS 6	PS 7	Průměr
15	100	100	100	100	100	100	100	100
7,5	100	100	100	100	100	100	100	100
3,75	100	100	100	100	100	100	100	100
1,875	99	92	97	98	92	95	96	96
0,938	85	80	82	82	80	80	82	82
0,469	16	25	16	19	12	10	16	16
0,234	5	6	7	5	7	6	8	6
0,117	3	6	5	5	6	6	7	5
0,0586	3	2	5	0	5	6	5	4
0,0293	0	2	3	5	3	5	5	3
0,0147	3	2	0	5	2	3	2	2
0,00732	0	0	0	0	0	0	0	0
0,00366	0	0	0	0	0	0	0	0
0,00183	0	0	0	0	0	0	0	0

PS 1 – 7 .... paralelní stanovení č. 1 - 7

Graf č. 8: *Artemia salina* a standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)



Pomocí programu Prisma jsme nelineární regresí zjistili  $EC_{50}$  0,6369 mmol/l (95% interval spolehlivosti 0,5177 - 0,7837 mmol/l).

$EC_{50}$  standardního toxinu chloridu manganatého ( $MnCl_2$ ) byla 0,0142 mmol/l.

#### 4.1.4. **Standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola**

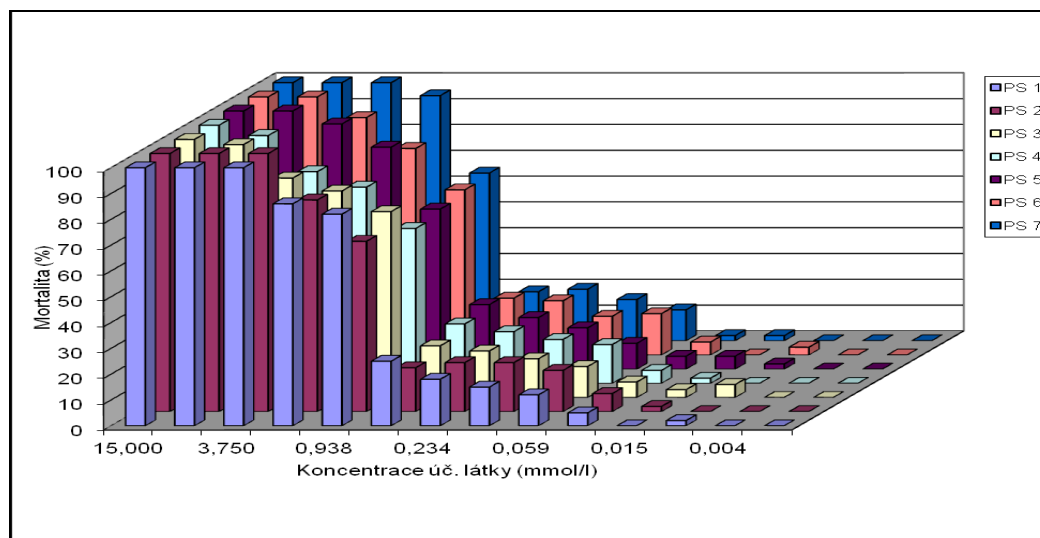
- délka testu: 24 hodin (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 8:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)							
	PS 1	PS 2	PS 3	PS 4	PS 5	PS 6	PS 7	Průměr
15	100	100	100	100	100	100	100	100
7,5	100	100	98	96	100	100	100	99
3,75	100	100	85	82	95	92	100	93
1,875	86	82	80	76	86	80	95	84
0,938	82	66	72	60	62	64	65	67
0,469	25	17	20	23	25	22	19	22
0,234	18	19	18	20	20	21	20	19
0,117	15	19	15	17	16	15	16	16
0,0586	12	16	12	15	10	16	12	13
0,0293	5	7	6	5	5	5	2	5
0,0147	0	2	3	2	5	0	2	2
0,00732	2	0	5	0	2	3	0	2
0,00366	0	0	0	0	0	0	0	0
0,00183	0	0	0	0	0	0	0	0

PS 1 – 7 .... paralelní stanovení č. 1 - 7

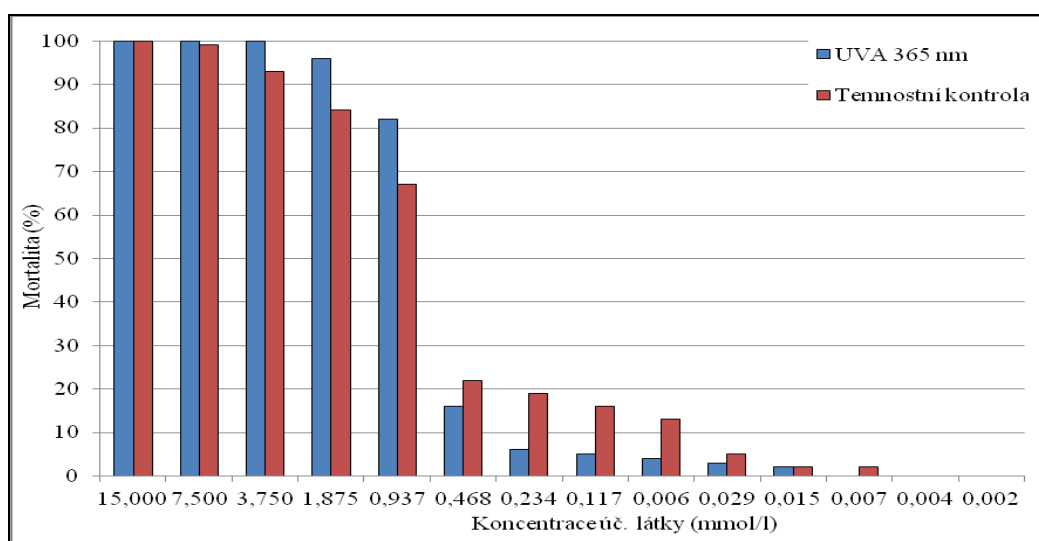
Graf č. 9: *Artemia salina* a standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola



Pomocí programu Prisma jsme nelineární regresí zjistili  $EC_{50}$  0,6637 mmol/l (95% interval spolehlivosti 0,5794 – 0,7602 mmol/l).

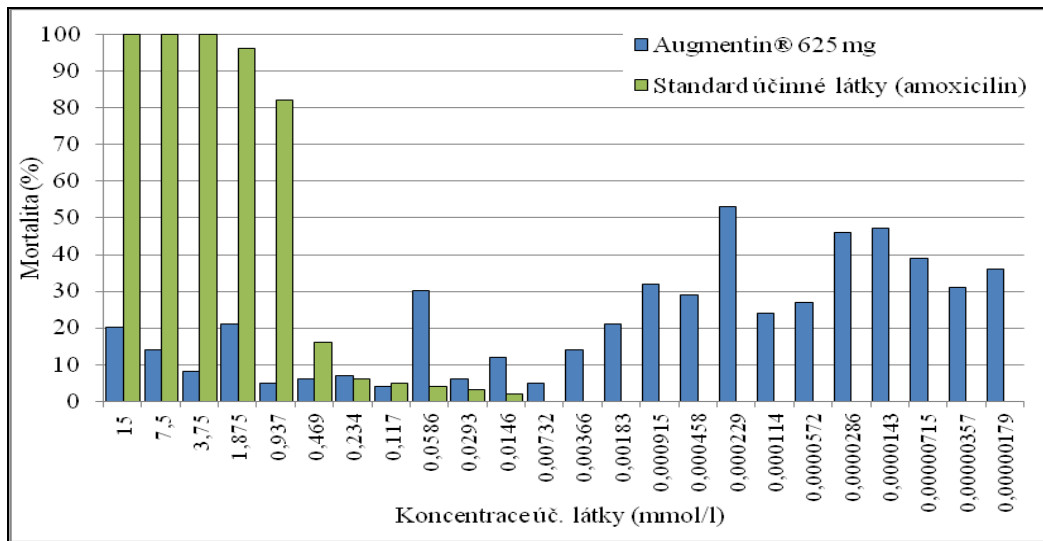
$EC_{50}$  standardního toxinu chloridu manganatého ( $MnCl_2$ ) byla 0,0142 mmol/l.

Graf č. 10: Porovnání průměrných hodnot mortality *Artemia salina* ve standardu účinné látky (amoxicilinu)

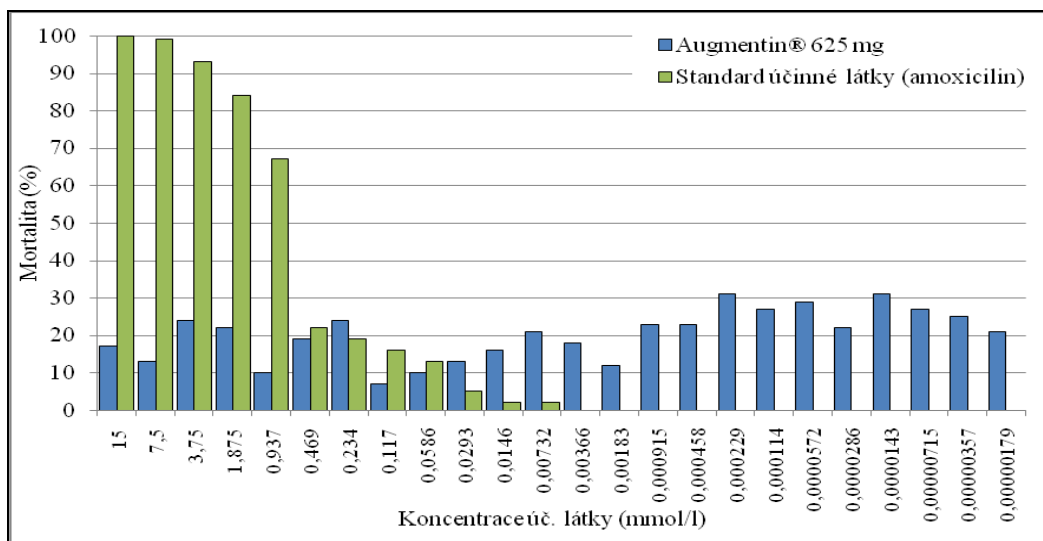


Ze získaných výsledků je jasné, že standard účinné látky je toxičtější při působení UVA 365 nm ( $EC_{50}$  0,6369 mmol/l) než v temnostní kontrole ( $EC_{50}$  0,6637 mmol/l) a tudíž je fototoxický.

Graf č. 11: Porovnání hodnot mortality z tabulek výsledků č. 3 a 7 - *Artemia salina* po působení UVA (365 nm)



Graf č. 12: Porovnání hodnot mortality z tabulek výsledků č. 6 a 8 - *Artemia salina* v temnostních kontrolách



Z grafů je vidět, že *A. salina* ve stejných koncentracích reagovala toxicky na standard, zatímco na Augmentin® 625 mg ne.

## 4.2. *Brachionus calyciflorus*

### 4.2.1. Rotoxkit F

#### 4.2.1.1. **Augmentin<sup>®</sup> 625 mg** – efekt vlivu UVA (365 nm)

- délka testu: 24 hodin (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, působení UVA po dobu 30 minut

Tabulka výsledků č. 9: *primární data získaná z experimentu s Brachionus calyciflorus a Augmentinem<sup>®</sup> 625 mg – efekt vlivu UVA (365 nm) (mrtví / celkový počet vířníků)*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	A	B	C	Mortalita (%)
K	0	1 / 5	0 / 5	0 / 5	7
c 5	0,0681	0 / 6	0 / 6	0 / 5	0
c 4	0,136	0 / 5	0 / 6	0 / 5	0
c 3	0,272	0 / 6	0 / 5	0 / 4	0
c 2	0,545	0 / 5	0 / 4	1 / 6	7
c 1	1,089	0 / 5	0 / 4	0 / 8	0

K ... kontrola

c ... koncentrace

A, B, C ... paralelní stanovení v testu

V rozsahu testovaných koncentrací nebyly výsledky průkazné a tak nebylo možné stanovit EC<sub>50</sub>.

#### 4.2.1.2. Augmentin<sup>®</sup> 625 mg – temnostní kontrola

- délka testu: 24 hodin (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 10: *primární data získaná z experimentu s Brachionus calyciflorus a Augmentinem<sup>®</sup> 625 mg – temnostní kontrola (mrtví / celkový počet vířníků)*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	A	B	C	Mortalita (%)
K	0	2 / 9	0 / 8	0 / 8	8
c 5	0,0681	0 / 6	0 / 6	1 / 6	6
c 4	0,136	0 / 7	0 / 5	0 / 6	0
c 3	0,272	0 / 5	0 / 8	0 / 7	0
c 2	0,545	0 / 6	0 / 4	0 / 7	0
c 1	1,089	0 / 4	0 / 5	0 / 5	0

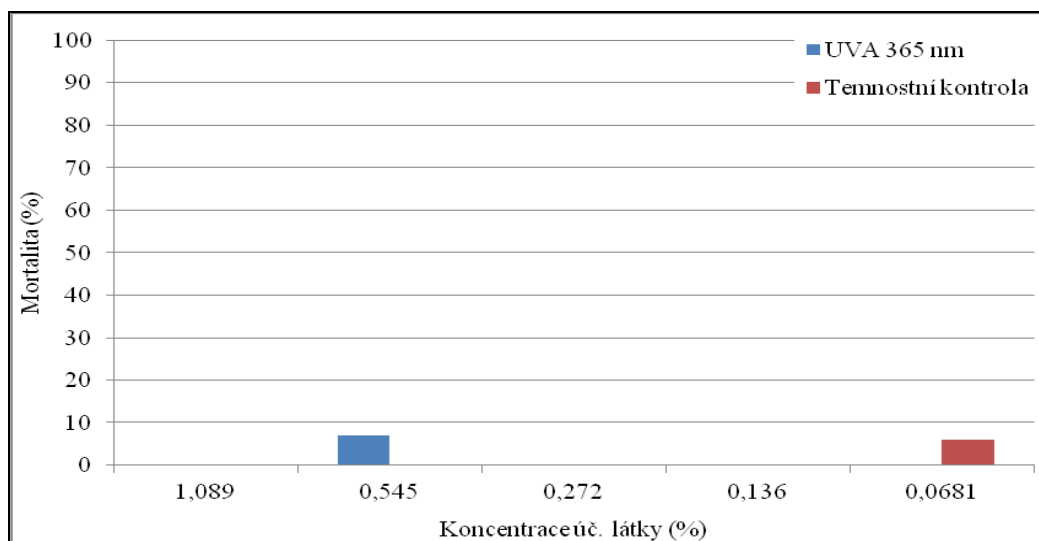
K ... kontrola

c ... koncentrace

A, B, C ... paralelní stanovení v testu

V rozsahu testovaných koncentrací nebyly výsledky průkazné a tak nebylo možné stanovit EC<sub>50</sub>.

Graf č. 13: Porovnání průměrných hodnot mortality *Brachionus calyciflorus* v Augmentinu® 625 mg



Ze získaných výsledků není možné vyvodit žádné závěry.



#### 4.2.1.3. Standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)

- délka testu: 24 hodin (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, působení UVA po dobu 30 minut

Tabulka výsledků č. 11: *primární data získaná z experimentu s Brachionus calyciflorus a standardem účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm) (mrtví / celkový počet vířníků)*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Mortalita (%)
K	0	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 6	0 / 5	0 / 5	2
c 5	0,0681	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 4	0 / 5	0 / 4	1 / 5	0 / 2	5
c 4	0,136	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 2	0 / 3	0 / 7	1 / 8	0 / 8	4
c 3	0,272	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 3	1 / 5	0 / 6	1 / 6	0 / 7	6
c 2	0,545	1 / 5	2 / 5	0 / 6	0 / 5	0 / 5	0 / 6	0 / 5	0 / 5	0 / 5	6
c 1	1,089	1 / 5	2 / 5	0 / 5	1 / 5	1 / 5	0 / 5	2 / 5	0 / 5	2 / 6	20

K ... kontrola

c ... koncentrace

A – I ... paralelní stanovení v testu

V rozsahu testovaných koncentrací nebyly výsledky průkazné a tak nebylo možné stanovit EC<sub>50</sub>.

#### 4.2.1.4. Standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola

- délka testu: 24 hodin (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 12: *primární data získaná z experimentu s Brachionus calyciflorus a standardem účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola (mrtví / celkový počet vířníků)*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Mortalita (%)
K	0	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 4	0 / 5	0 / 5	0 / 9	0 / 7	0 / 8	2
c 5	0,0681	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 4	0 / 5	0 / 5	0
c 4	0,136	0 / 5	1 / 6	0 / 5	1 / 5	0 / 2	0 / 3	0 / 3	0 / 7	0 / 8	5
c 3	0,272	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 6	0 / 4	1 / 7	2
c 2	0,545	0 / 5	0 / 5	1 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 4	1 / 5	0 / 5	0 / 7	7
c 1	1,089	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	4

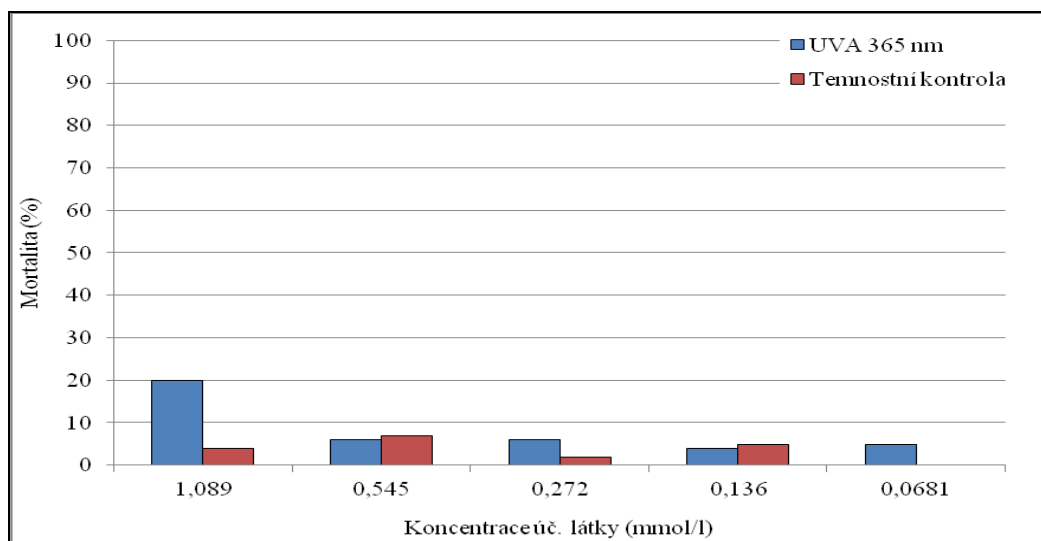
K ... kontrola

c ... koncentrace

A – I ... paralelní stanovení v testu

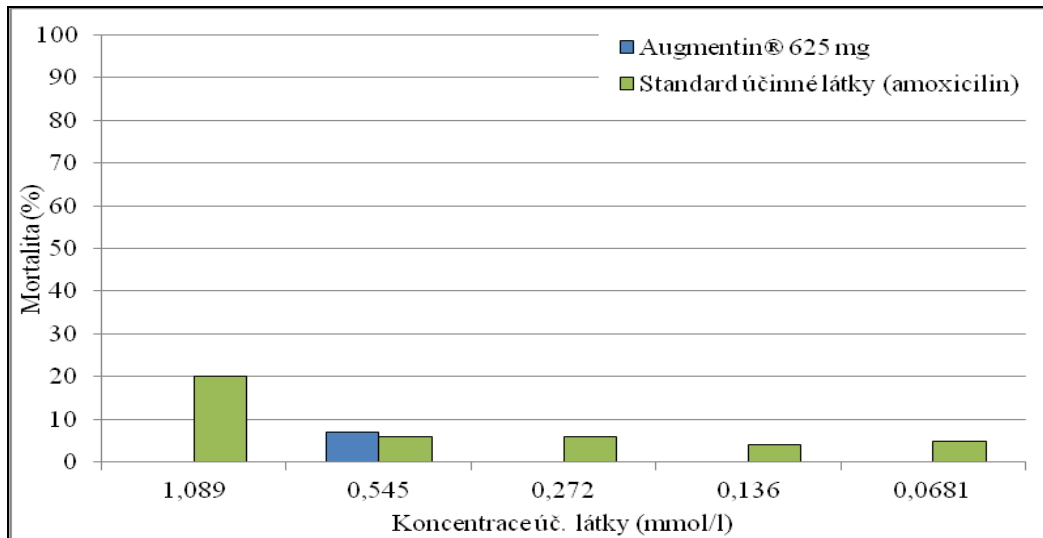
V rozsahu testovaných koncentrací nebyly výsledky průkazné a tak nebylo možné stanovit EC<sub>50</sub>.

Graf č. 14: Porovnání průměrných hodnot mortality *Brachionus calyciflorus* ve standardu účinné látky (amoxicilinu)

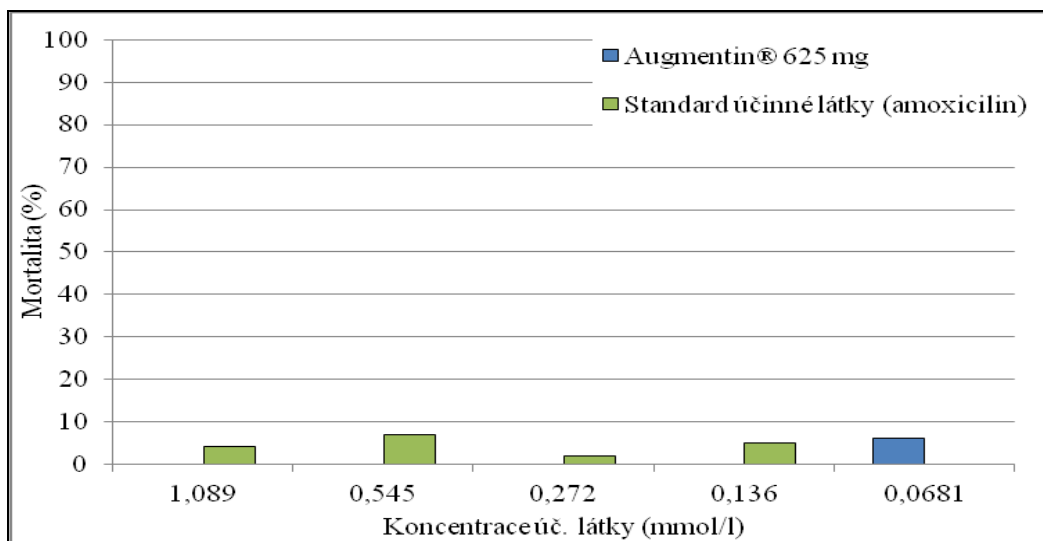


Ze získaných výsledků nebylo možné vyvodit žádné závěry.

Graf č. 15: Porovnání průměrných hodnot mortality z tabulek výsledků č. 9 a 11 - *Brachionus calyciflorus* po působení UVA (365 nm)



Graf č. 16: Porovnání průměrných hodnot mortality z tabulek výsledků č. 10 a 12 - *Brachionus calyciflorus* v temnostních kontrolách



Z těchto grafů nelze vyvodit žádné závěry.

#### 4.2.2. Rotoxkit F Chronic

##### 4.2.2.1. **Augmentin<sup>®</sup> 625 mg** – efekt vlivu UVA (365 nm)

- délka testu: 48 hodin (test chronické toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, působení UVA po dobu 30 minut

Tabulka výsledků č. 13: *primární data získaná z experimentu chronické toxicity s Brachionus calyciflorus a Augmentinem<sup>®</sup> 625 mg - efekt vlivu UVA (365 nm)*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	1	2	3	4
K	0	+ / +1	+ / +1	+	+
c 5	0,0681	+	+	+ / +1	+
c 4	0,136	-	+ / +1	+ / +1	+
c 3	0,272	+	+	+ / +1	+
c 2	0,545	+	+ / +1	+	+ / +1
c 1	1,089	+	+	+	+

K ... kontrola

+ ... vířník přežil / + nový vířník

c ... koncentrace

- ... vířník zemřel

1 – 4 ... paralelní stanovení v testu

V rozsahu testovaných koncentrací nebyly výsledky průkazné a tak nebylo možné stanovit EC<sub>50</sub>.

#### 4.2.2.2. **Augmentin® 625 mg** – temnostní kontrola

- délka testu: 48 hodin (test chronické toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 14: *primární data získaná z experimentu chronické toxicity s Brachionus calyciflorus a Augmentinem® 625 mg – temnostní kontrola*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	1	2	3	4
K	0	+ / +1	+ / +1	+	+
c 5	0,0681	+ / +2	+ / +2	+	+ / +2
c 4	0,136	+ / +1	+ / +1	+ / +1	+
c 3	0,272	+ / +1	+	+ / +2	+ / +3
c 2	0,545	+ / +1	+ / +1	+ / +5	+ / +2
c 1	1,089	+ / +2	+	+ / +3	+ / +1

K ... kontrola

+ ... vířník přežil / + nový vířník

c ... koncentrace

- ... vířník zemřel

1 – 4 ... paralelní stanovení v testu

V rozsahu testovaných koncentrací nebyly výsledky průkazné a tak nebylo možné stanovit EC<sub>50</sub>.

#### 4.2.2.3. Standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)

- délka testu: 48 hodin (test chronické toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, působení UVA po dobu 30 minut

Tabulka výsledků č. 15: *primární data získaná z experimentu chronické toxicity s Brachionus calyciflorus a standardem účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	1	2	3	4	5	6	7	8
K	0	+	+	-	+	+	+	+	-
c 5	0,0681	+	+	+	+	-	-	+	-
c 4	0,136	-	+	+	+	+	+	+	-
c 3	0,272	-	+	+	-	+	+	+	+
c 2	0,545	+	-	+	+	+	+	-	+
c 1	1,089	+	+	-	+	+	+	+	+

Tabulka výsledků č. 16: *primární data získaná z experimentu chronické toxicity s Brachionus calyciflorus a standardem účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	1	2	3	4
K	0	+	+	+	-
c 5	0,0681	+ / +1	+	+	+
c 4	0,136	+	+	+	+
c 3	0,272	+	+	-	+
c 2	0,545	+	+	+	+
c 1	1,089	+	+	+	+

K ... kontrola

+ ... vířník přežil / + nový vířník

c ... koncentrace

- ... vířník zemřel

1 - 8... paralelní stanovení v testu

V rozsahu testovaných koncentrací nebyly výsledky průkazné a tak nebylo možné stanovit EC<sub>50</sub>.

#### 4.2.2.4. Standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola

- délka testu: 48 hodin (test chronické toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 25 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 17: *primární data získaná z experimentu chronické toxicity s Brachionus calyciflorus a standardem účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	1	2	3	4	5	6	7	8
K	0	+	-	+	+	+	+	+	+
c 5	0,0681	+	+	+	-	+	+	+	-
c 4	0,136	+	+	+	+	-	-	-	-
c 3	0,272	+	-	-	-	-	-	-	-
c 2	0,545	+	+	-	+	+	+	+	+
c 1	1,089	-	+	+	-	+	+	+	-

Tabulka výsledků č. 18: *primární data získaná z experimentu chronické toxicity s Brachionus calyciflorus a standardem účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola*

	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	1	2	3	4
K	0	+ / +1	+	+	-
c 5	0,0681	+	-	+	+
c 4	0,136	+	+	+ / +2	+ / +2
c 3	0,272	+ / +1	+	+	+
c 2	0,545	+	+ / +1	+	+
c 1	1,089	+	+	+	+

K ... kontrola

+ ... vířník přežil / + nový vířník

c ... koncentrace

- ... vířník zemřel

1 – 8 ... paralelní stanovení v testu

V rozsahu testovaných koncentrací nebyly výsledky průkazné a tak nebylo možné stanovit EC<sub>50</sub>.



### 4.3. *Sinapis alba*, L.

#### 4.3.1. **Augmentin<sup>®</sup> 625 mg**

- délka testu: 72 hodin
- podmínky experimentu: teplota 20 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 19:

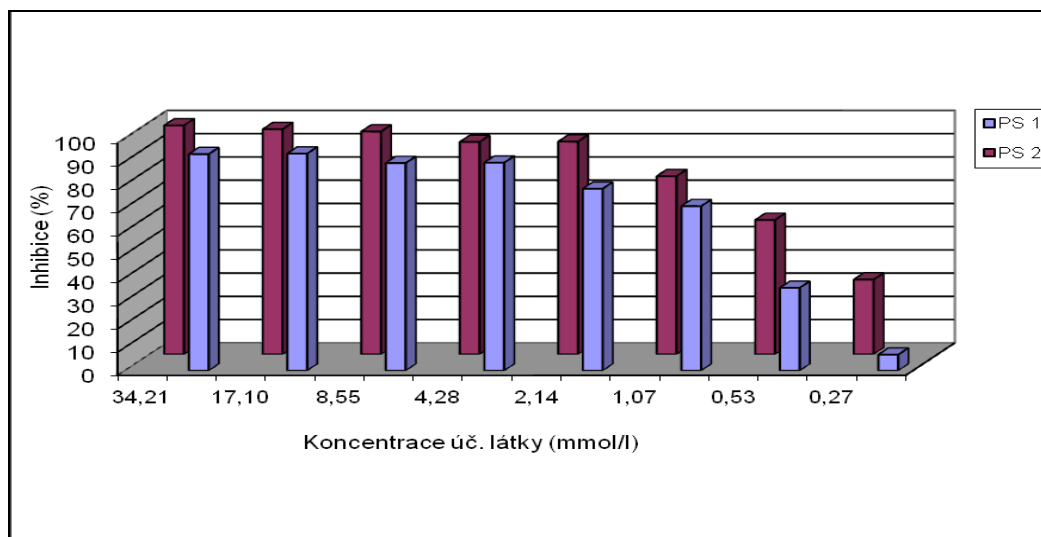
Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Inhibice (%)
	PS 1
24,88	93
12,44	93
6,22	89
3,11	89
1,55	78
0,78	71
0,39	36
0,19	7

Tabulka výsledků č. 20:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Inhibice (%)
	PS 2
34,21	98
17,10	97
8,55	96
4,28	91
2,14	92
1,07	77
0,53	58
0,27	32

PS 1, 2 .... paralelní stanovení č. 1, 2

Graf č. 17: *Sinapis alba* a Augmentin<sup>®</sup> 625 mg



Z grafu jsme získali pro Augmentin<sup>®</sup> 625 mg hodnotu IC<sub>50</sub> 0,4999 mmol/l.

IC<sub>50</sub> standardního toxinu dichromanu draselného (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) byla 0,0332 mmol/l.

#### 4.3.2. **Standard účinné látky (amoxicilin)**

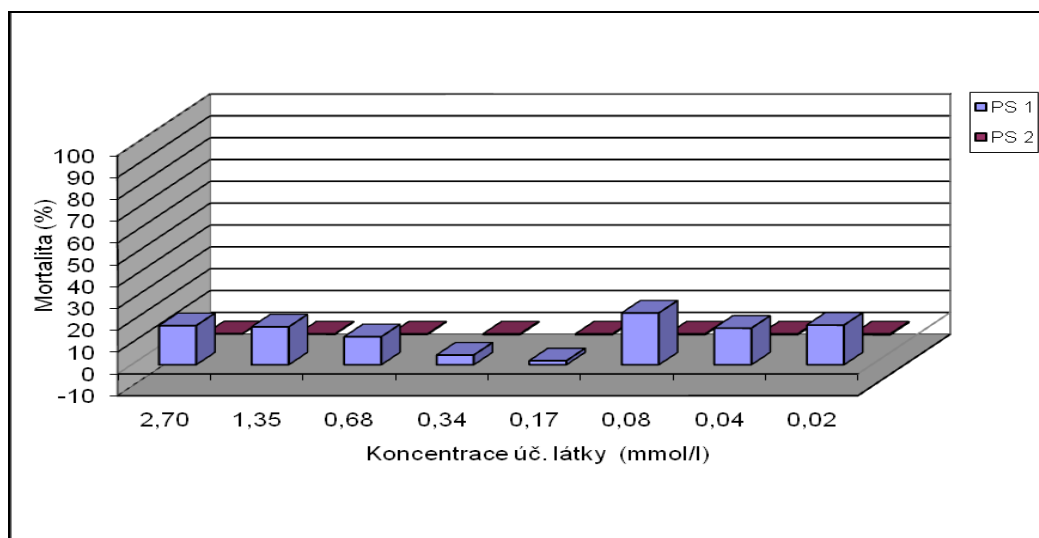
- délka testu: 72 hodin
- podmínky experimentu: teplota 20 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 21:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Inhibice (%)		
	PS 1	PS 2	Průměr
2,701	18	0,06	9
1,35	17	-0,17	8
0,675	13	-0,25	6
0,338	4	-0,29	2
0,169	2	-0,33	1
0,084	24	-0,35	12
0,042	17	-0,37	8
0,021	18	-0,39	9

PS 1, 2 .... paralelní stanovení č. 1, 2

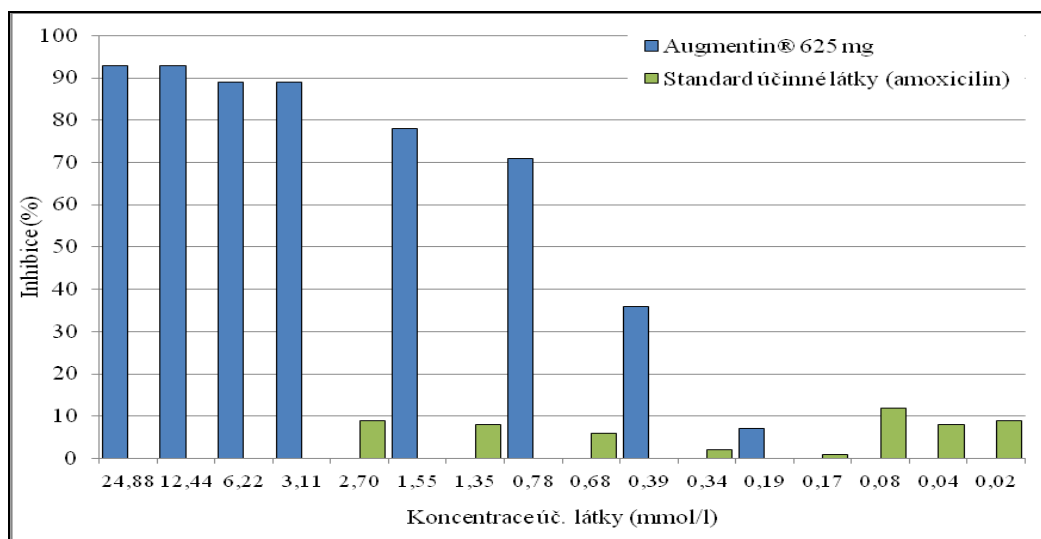
Graf č. 18: *Sinapis alba* a standard účinné látky (amoxicilin)



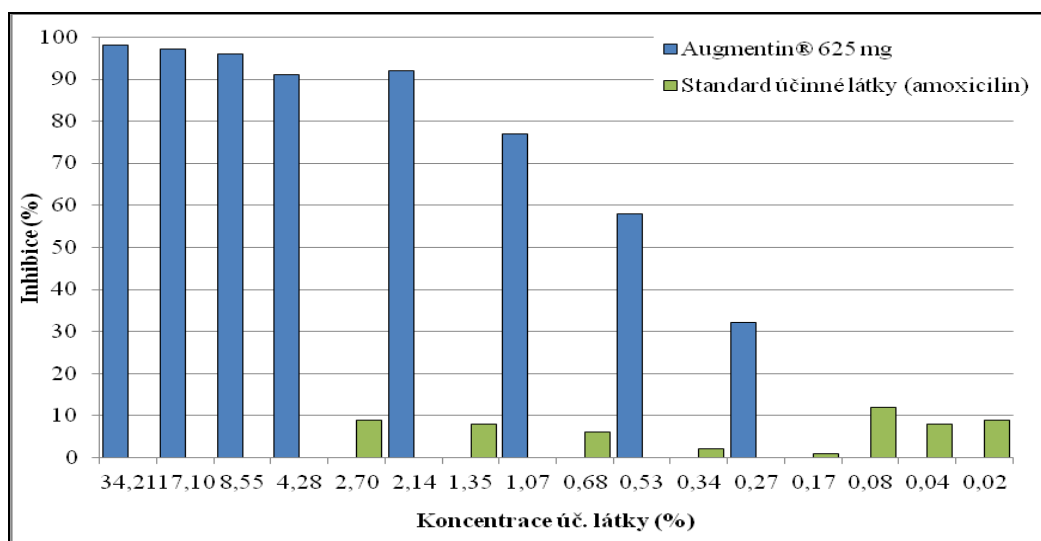
Ze získaných dat nebylo možné stanovit IC<sub>50</sub>.

IC<sub>50</sub> standardního toxinu dichromanu draselného (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) byla 0,0332 mmol/l.

Graf č. 19: Porovnání hodnot inhibice v Augmentinu® 625 mg z tabulky výsledků č. 19 a průměrných hodnot inhibice standardu z tabulky výsledků č. 18



Graf č. 20: Porovnání hodnot inhibice v Augmentinu® 625 mg z tabulky výsledků č. 20 a průměrných hodnot inhibice standardu z tabulky výsledků č. 18



Z grafů vyplývá, že při podobné koncentraci standard nedosahuje takové inhibice jako léčivo a tudíž se domníváme, že Augmentin® 625 mg obsahuje látky, které působí inhibičně na klíčení *S. alba*.

## 4.4. *Tubifex tubifex*

### 4.4.1. **Augmentin® 625 mg** – efekt vlivu UVA 365 nm

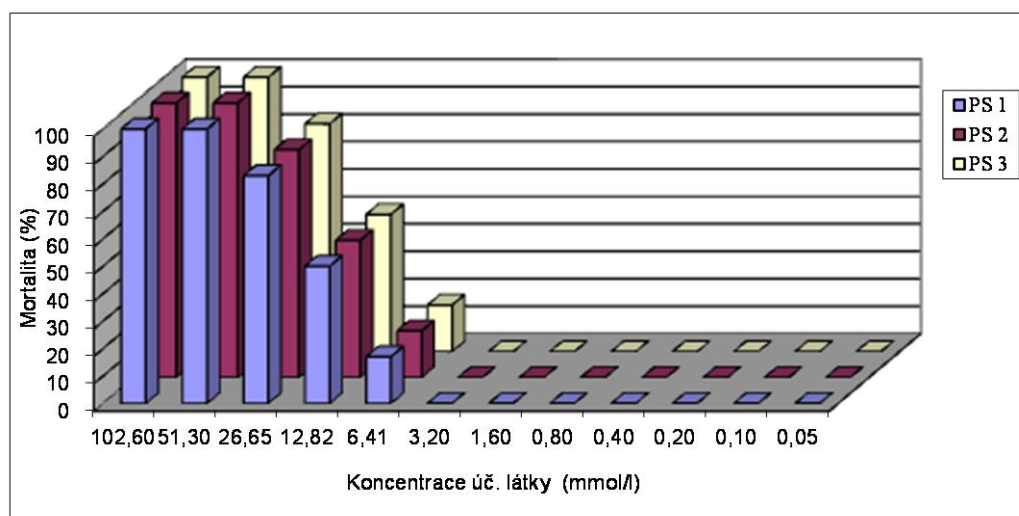
- délka testu: 30 minut (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 20 °C, s přístupem světla

Tabulka výsledků č. 22:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)			
	PS 1	PS 2	PS 3	Průměr
102,6	100	100	100	100
51,3	100	100	100	100
26,65	83	83	83	83
12,82	50	50	50	50
6,41	17	17	17	17
3,2	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0
0,801	0	0	0	0
0,401	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0
0,0501	0	0	0	0

PS 1, 2, 3 .... paralelní stanovení č. 1, 2, 3

Graf č. 21: *Tubifex tubifex* a *Augmentin®* 625 mg – efekt vlivu UVA (365 nm)



Pomocí programu Prisma jsme nelineární regresí zjistili  $EC_{50}$  13,11 mmol/l (95% interval spolehlivosti: 9,873 - 17,40 mmol/l).

$EC_{50}$  standardního toxinu chloridu manganatého ( $MnCl_2$ ) byla 68,64 mmol/l.

#### 4.4.2. **Augmentin® 625 mg** – temnostní kontrola

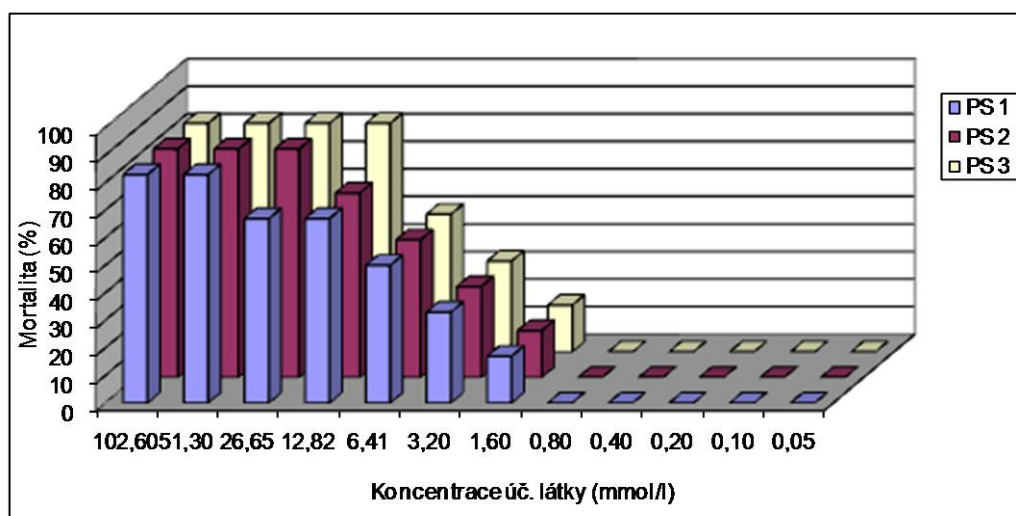
- délka testu: 30 minut (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 20 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 23:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)			
	PS 1	PS 2	PS 3	Průměr
102,6	83	83	83	83
51,3	83	83	83	83
26,65	67	83	83	78
12,82	67	67	83	72
6,41	50	50	50	50
3,2	33	33	33	33
1,6	17	17	17	17
0,801	0	0	0	0
0,401	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0
0,0501	0	0	0	0

PS 1, 2, 3 .... paralelní stanovení č. 1, 2, 3

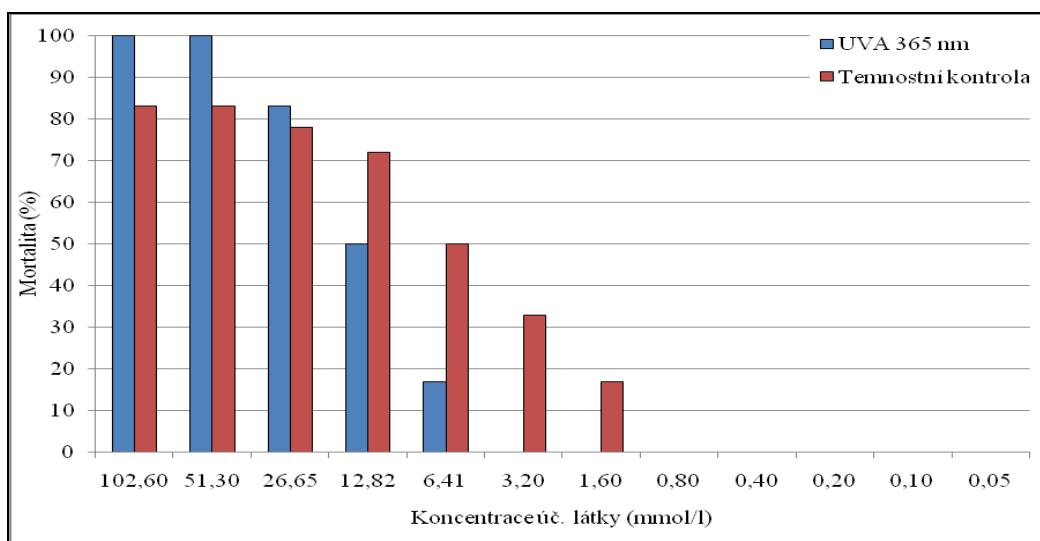
Graf č. 22: *Tubifex tubifex* a **Augmentin® 625 mg** – temnostní kontrola



Pomocí programu Prisma jsme nelineární regresí zjistili  $EC_{50}$  4,567 mmol/l (95% interval spolehlivosti: 0,1860 - 112,1 mmol/l).

$EC_{50}$  standardního toxinu chloridu manganatého ( $MnCl_2$ ) byla 68,64 mmol/l.

Graf č. 23: Porovnání průměrných hodnot mortality *Tubifex tubifex* v Augmentinu<sup>®</sup> 625 mg



Ze získaných výsledků jsme zjistili, že Augmentin<sup>®</sup> 625 mg není pro *Tubifex tubifex* fototoxický. Při působení UVA 365 nm je hodnota  $EC_{50}$  (13,11 mmol/l) vyšší než v temnostní kontrole (4,567 mmol/l), tj. je méně toxický.

#### 4.4.3. **Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml** – efekt vlivu UVA 365 nm

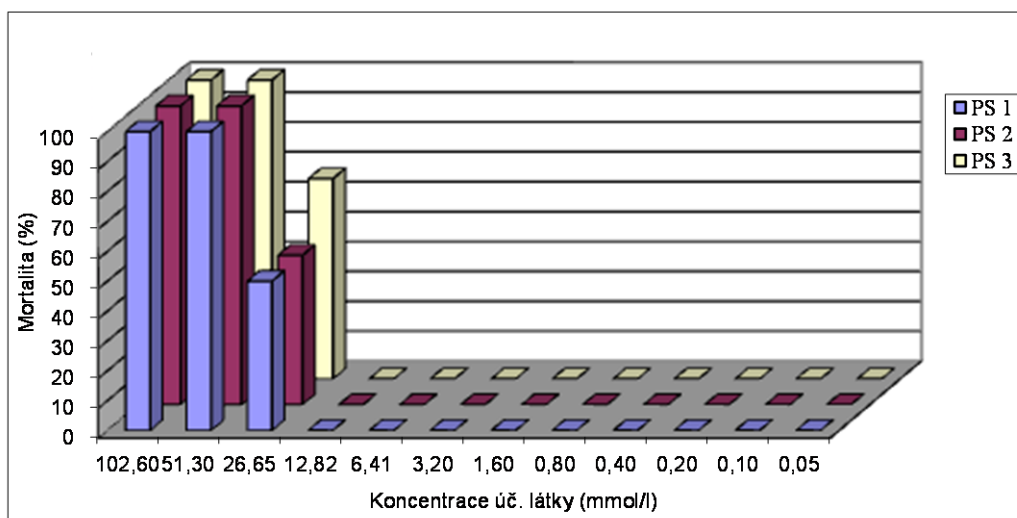
- délka testu: 30 minut (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 20 °C, s přístupem světla

Tabulka výsledků č. 24:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)			
	PS 1	PS 2	PS 3	Průměr
102,6	100	100	100	100
51,3	100	100	100	100
26,65	50	50	67	56
12,82	0	0	0	0
6,41	0	0	0	0
3,2	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0
0,801	0	0	0	0
0,401	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0
0,0501	0	0	0	0

PS 1, 2, 3 .... paralelní stanovení č. 1, 2, 3

Graf č. 24: *Tubifex tubifex* a *Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml* – efekt vlivu UVA (365 nm)





Pomocí programu Prisma jsme nelineární regresí zjistili  $EC_{50}$  25,88 mmol/l (95% interval spolehlivosti: 17,12 - 39,14 mmol/l).

$EC_{50}$  standardního toxinu chloridu manganatého ( $MnCl_2$ ) byla 68,64 mmol/l.

#### 4.4.4. **Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml – temnostní kontrola**

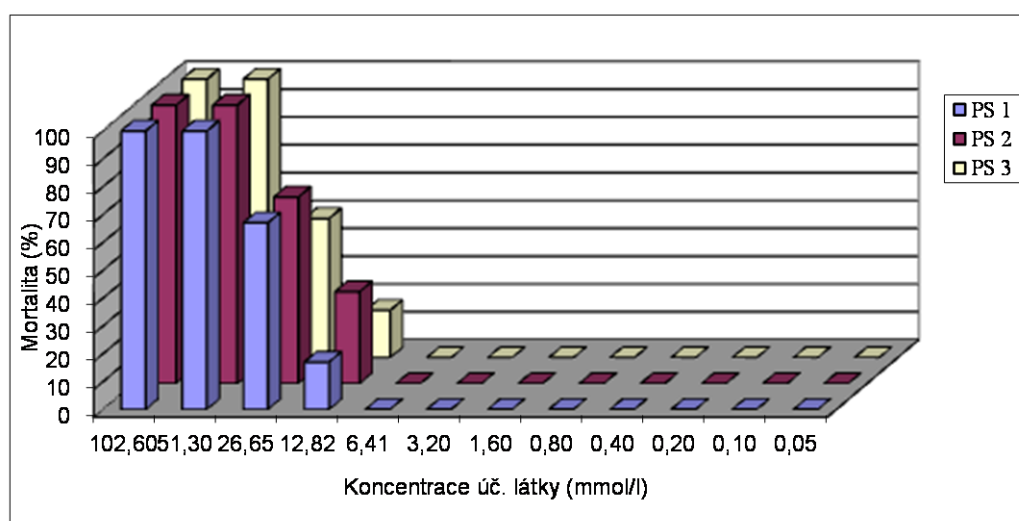
- délka testu: 30 minut (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 20 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 25:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)			
	PS 1	PS 2	PS 3	Průměr
102,6	100	100	100	100
51,3	100	100	100	100
26,65	67	67	50	61
12,82	17	33	17	22
6,41	0	0	0	0
3,2	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0
0,801	0	0	0	0
0,401	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0
0,0501	0	0	0	0

PS 1, 2, 3 .... paralelní stanovení č. 1, 2, 3

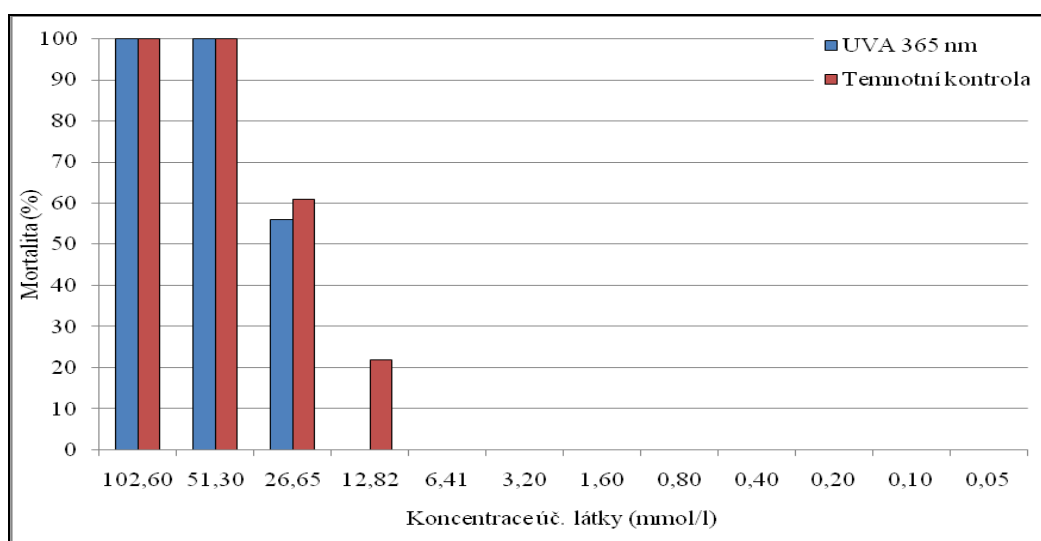
Graf č. 25: *Tubifex tubifex* a *Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml – temnostní kontrola*



Pomocí programu Prisma jsme nelineární regresí zjistili  $EC_{50}$  21,18 mmol/l (95% interval spolehlivosti 15,00 - 29,89 mmol/l).

$EC_{50}$  standardního toxinu chloridu manganatého ( $MnCl_2$ ) byla 68,64 mmol/l.

Graf č. 26: Porovnání průměrných hodnot mortality *Tubifex tubifex* v *Ospamoxu*<sup>®</sup> 375 mg/5 ml



Ze získaných výsledků jsme zjistili, že *Ospamox*<sup>®</sup> 375 mg/5 ml není pro *Tubifex tubifex* fototoxický. Při působení UVA 365 nm je hodnota  $EC_{50}$  (25,88 mmol/l) vyšší než v temnotní kontrole (21,18 mmol/l), tj. je méně toxický.

#### 4.4.5. Standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)

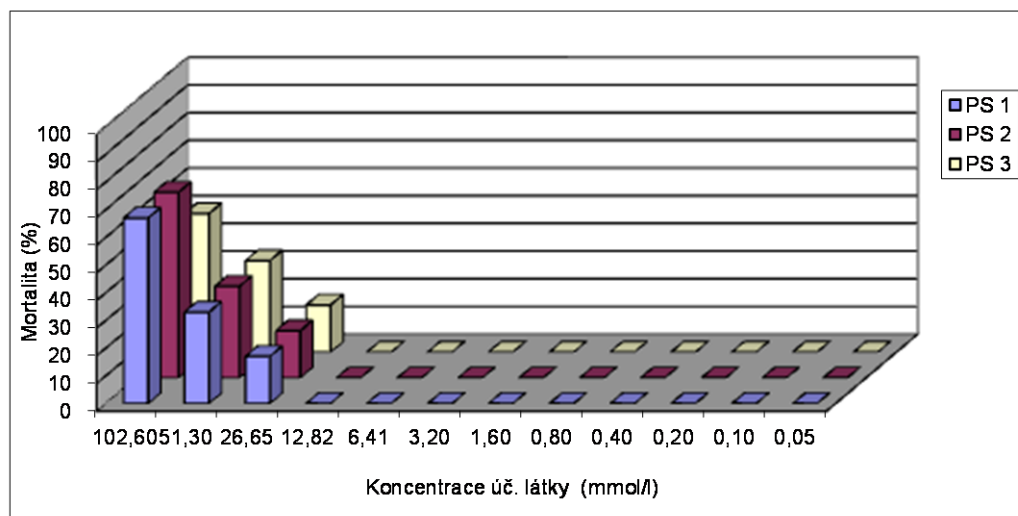
- délka testu: 30 minut (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 20 °C, s přístupem světla

Tabulka výsledků č. 26:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)			
	PS 1	PS 2	PS 3	Průměr
102,6	67	67	50	61
51,3	33	33	33	33
26,65	17	17	17	17
12,82	0	0	0	0
6,41	0	0	0	0
3,2	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0
0,801	0	0	0	0
0,401	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0
0,0501	0	0	0	0

PS 1, 2, 3 .... paralelní stanovení č. 1, 2, 3

Graf č. 27: *Tubifex tubifex* a standard účinné látky (amoxicilin) – efekt vlivu UVA (365 nm)



Pomocí programu Prisma jsme nelineární regresí zjistili  $EC_{50}$  98,93 mmol/l (95% interval spolehlivosti 83,62 - 117,1 mmol/l).

$EC_{50}$  standardního toxinu chloridu manganatého ( $MnCl_2$ ) byla 68,64 mmol/l.

#### 4.4.6. **Standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola**

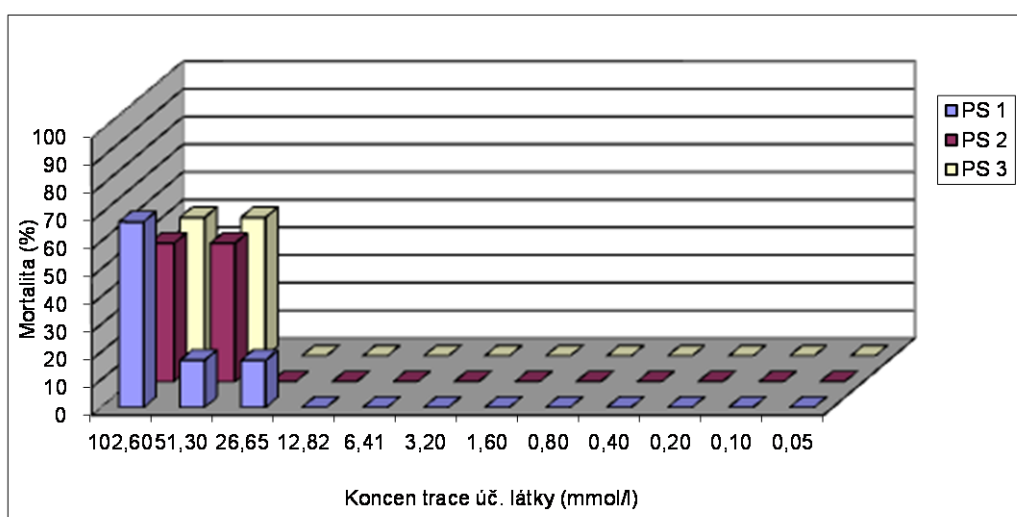
- délka testu: 30 minut (test akutní toxicity)
- podmínky experimentu: teplota 20 °C, bez přístupu světla

Tabulka výsledků č. 27:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Mortalita (%)			
	PS 1	PS 2	PS 3	Průměr
102,6	67	50	50	56
51,3	17	50	50	39
26,65	17	0	0	6
12,82	0	0	0	0
6,41	0	0	0	0
3,2	0	0	0	0
1,6	0	0	0	0
0,801	0	0	0	0
0,401	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0
0,0501	0	0	0	0

PS 1, 2, 3 .... paralelní stanovení č. 1, 2, 3

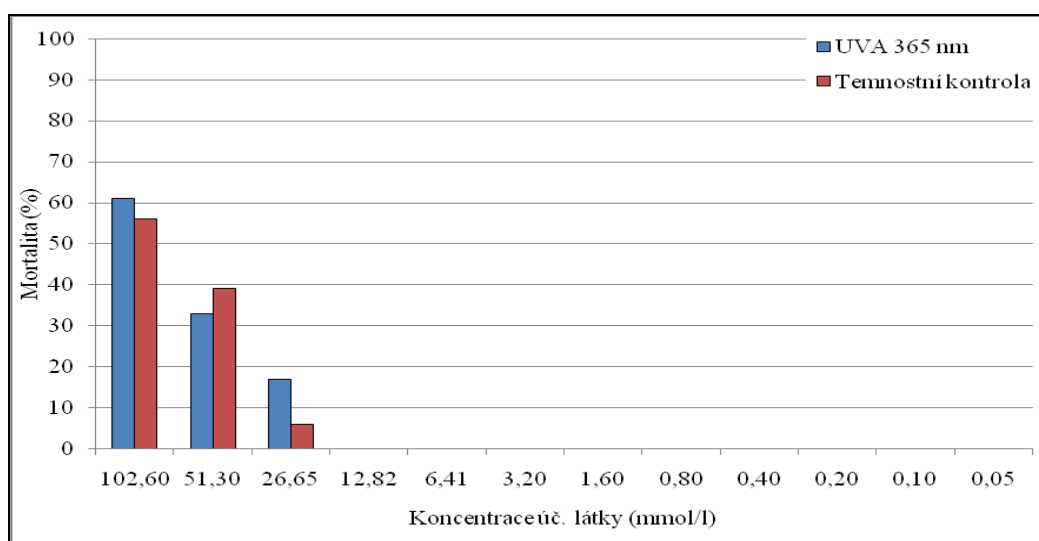
Graf č. 28: *Tubifex tubifex* a standard účinné látky (amoxicilin) – temnostní kontrola



Pomocí programu Prisma jsme nelineární regresí zjistili  $EC_{50}$  110,9 mmol/l (95% interval spolehlivosti 85,71 - 143,4 mmol/l).

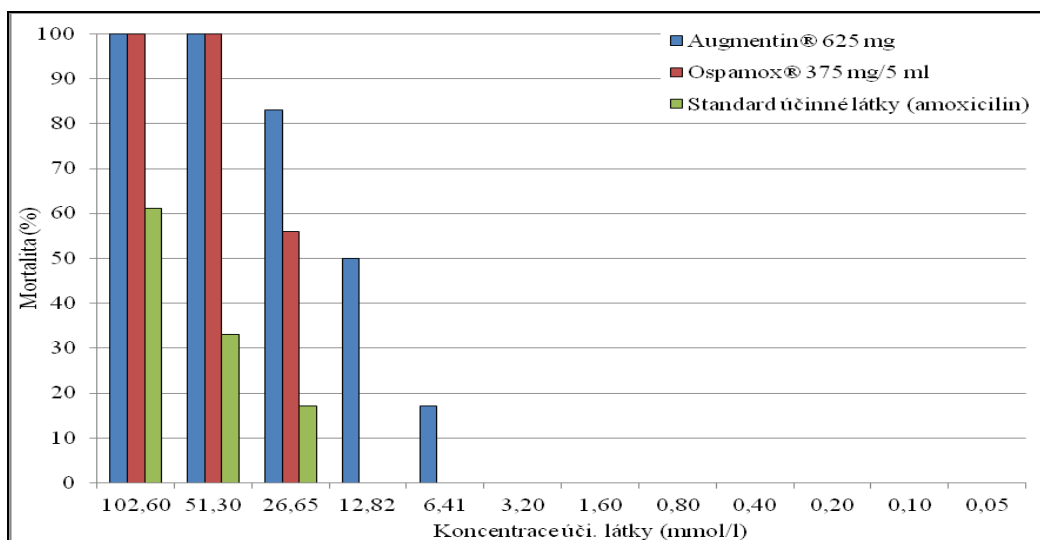
$EC_{50}$  standardního toxinu chloridu manganatého ( $MnCl_2$ ) byla 68,64 mmol/l.

Graf č. 29: Porovnání průměrných hodnot mortality *Tubifex tubifex* ve standardu účinné látky (amoxicilinu)

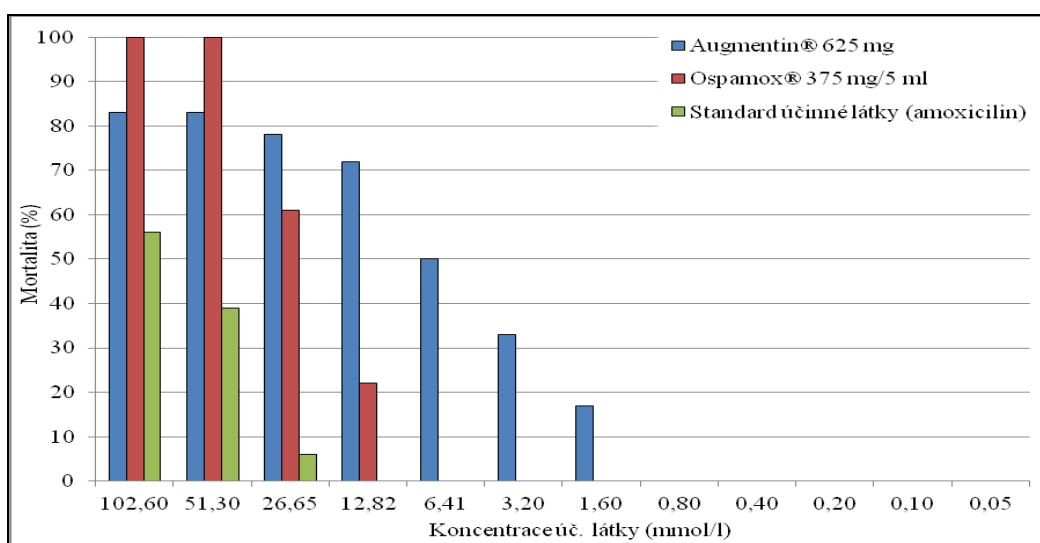


Ze získaných výsledků jsme zjistili, že standard účinné látky je fototoxický, protože  $EC_{50}$  při působení UVA 365 nm byla 98,93 mmol/l, zatímco v temnostní kontrole byla tato hodnota 110,9 mmol/l.

Graf č. 30: Porovnání průměrných hodnot mortality *Tubifex tubifex* po působení UVA (365 nm)



Graf č. 31: Porovnání průměrných hodnot mortality *Tubifex tubifex* v temnostních kontrolách

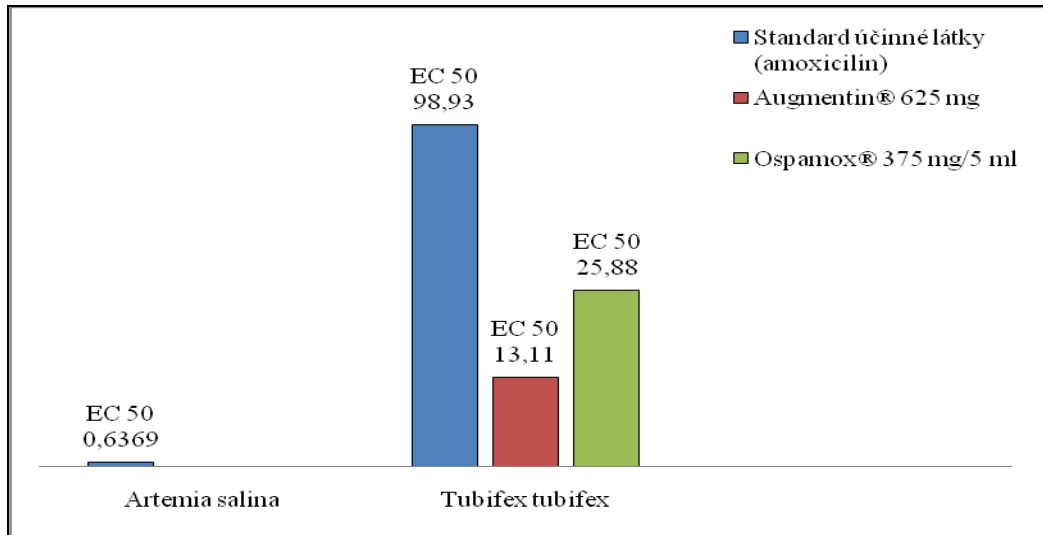


Z grafu vyplývá, že jak při působení UVA, tak v temnostních kontrolách je standard účinné látky v porovnání s léčivý nejmeně toxický a jako nejvíce toxický se ukázal Augmentin® 625 mg.

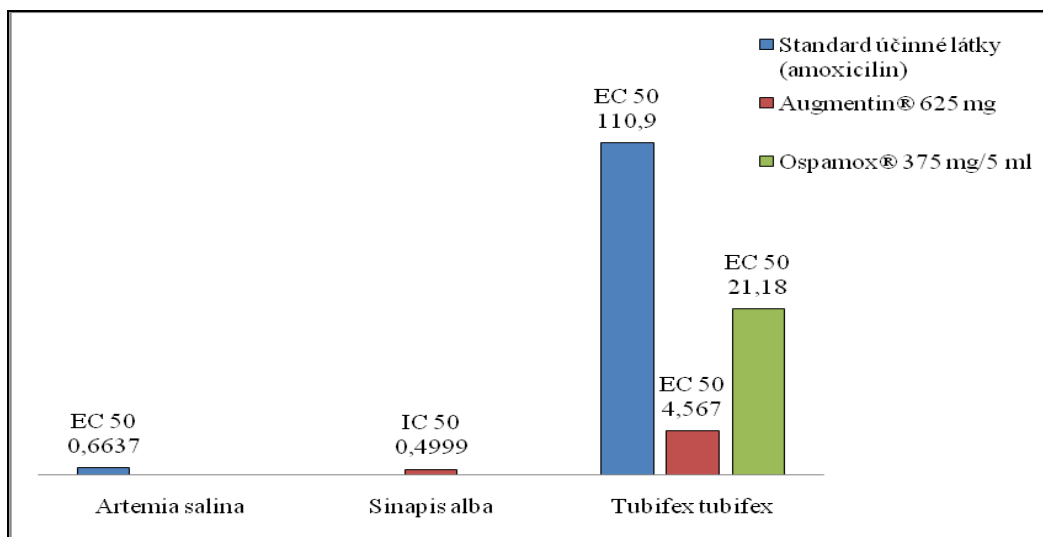


#### 4.5. Porovnání výsledků

Graf č. 32: Porovnání hodnot  $EC_{50}$  ( $IC_{50}$ ) jednotlivých organismů v testech s působením UVA 365 nm (v mmol/l)

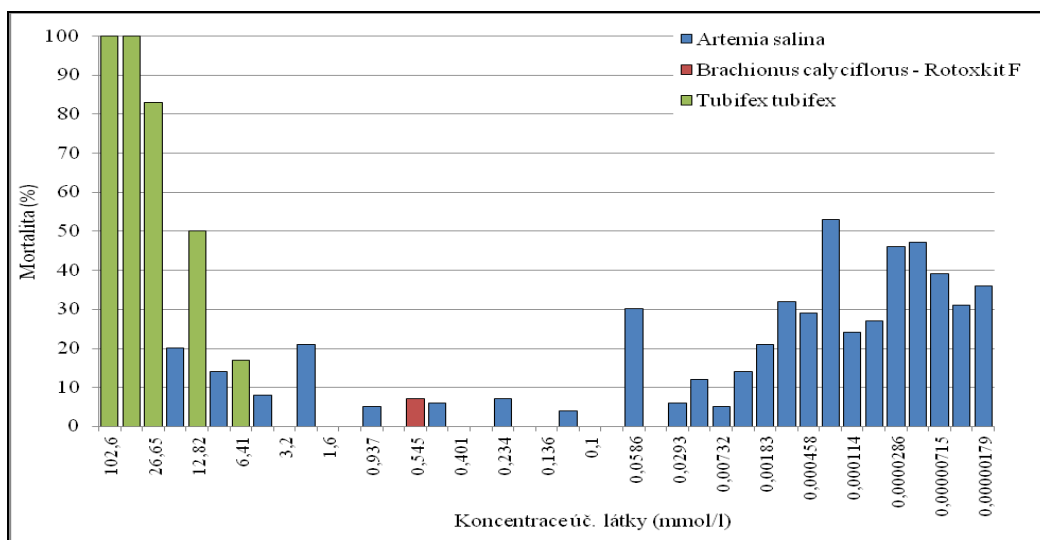


Graf č. 33: Porovnání hodnot  $EC_{50}$  ( $IC_{50}$ ) jednotlivých organismů v temnostních kontrolách (v mmol/l)

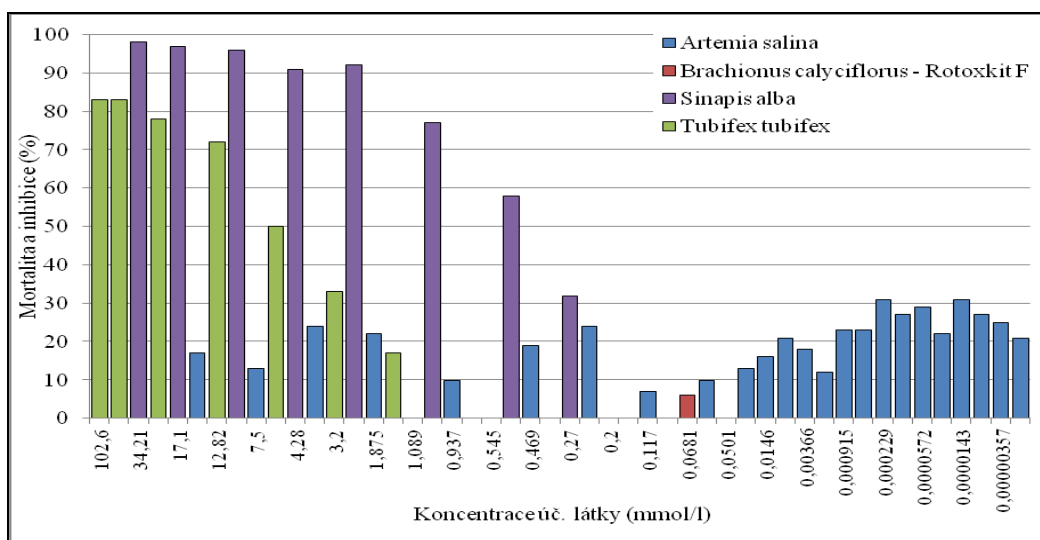


Získané výsledky ukázaly, že nitěnka je nejméně citlivým organismem při působení UVA 365 nm a v temnostních kontrolách jak pro léčiva, tak pro standard.

Graf č. 34: Porovnání hodnot získaných z testů jednotlivých organismů s Augmentinem® 625 mg při působení UVA (365 nm)



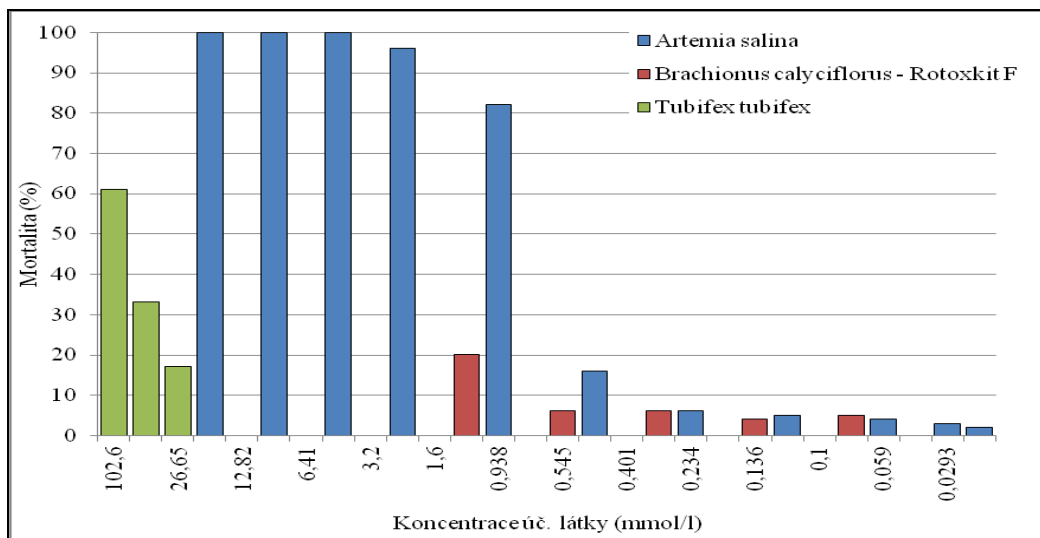
Graf č. 35: Porovnání hodnot získaných z testů jednotlivých organismů s Augmentinem® 625 mg v temnostních testech



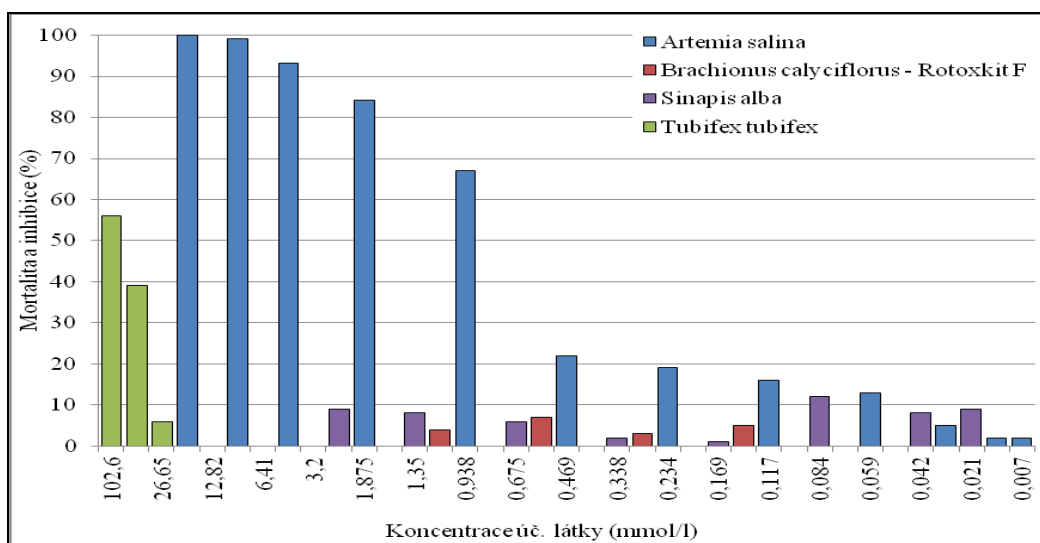
Z grafů je vidět, že se příliš neliší testy po působení UVA 365 nm od temnostních kontrol.

Poznámka: V grafech jsme uvedli hodnoty pro *A. salina* získané z tabulek výsledků č. 3 a 6 a tabulku výsledků č. 20 u *S. alba*, ve kterých jsme použili v rámci testů nejvyšší koncentrace.

Graf č. 36: Porovnání průměrných hodnot získaných z testů jednotlivých organismů se standardem amoxicilinu při působení UVA (365 nm)



Graf č. 37: Porovnání průměrných hodnot získaných z testů jednotlivých organismů se standardem amoxicilinu v temnostních testech



Z grafů je vidět, že se příliš neliší testy po působení UVA 365 nm a v temnostních kontrolách.

## **5. Diskuse**

Při ekotoxikologickém hodnocení vybraného léčiva jsme volili počáteční koncentraci přípravků (Augmentin® 625 mg, Ospamox® 375 mg/5 ml) tak, abychom je zcela využili, tzn., aby nám objem roztoku či suspenze vystačil na test beze zbytku. Jako další kritérium jsme určili možnou viditelnost organismu v roztoku (příp. suspenzi), který v nejvyšších testovaných koncentracích byl bílé barvy. *Artemia salina* a *Brachionus calyciflorus* jsou drobní živočichové a vířník je navíc na rozdíl od artémie průsvitný. Suspenzi jsme mohli zfiltrovat, ale pak bychom si nebyli jistí, jaké procento účinné látky by se na filtru zachytilo.

Při screeningu léčivých přípravků s obsahem amoxicilinu jsme vybrali za testovací organismy žábřonožku *Artemia salina*, L., vířníka *Brachionus calyciflorus* jako zástupce z řad konzumentů, bělohořčici *Sinapis alba*, L., producenta a zástupce vyšších rostlin, a nítěnku *Tubifex tubifex*, řazenou jak do skupiny konzumentů, tak destruentů.

Ostatní autoři, kteří studovali vliv amoxicilinu na životní prostředí, dávali spíše přednost řasovým testům toxicity. Obecně se ekotoxikologický vliv tohoto antibiotika studoval velmi málo.

Dle skupiny okolo Andreozziho (2004) řasové biologické zkoušky ukázaly, že v rozsahu koncentrací od 50 ng/l do 50 mg/l není amoxicilin toxický vůči eukaryotickým organismům, jako jsou řasy z čeledi Chlorophyceae *Pseudokirkneriella subcapitata* a *Closterium ehrenbergii* a Bacillariophyceae *Cyclotella meneghiniana*, ale ukázal značnou toxicitu vůči Cyanophyta *Synechococcus leopolensis*. Řasová toxicita amoxicilinu při chovu ryb pak byla studována skupinou okolo Lutzhofta (1999). U sladkovodní *Microcystis aeruginosa* byla zjištěna hodnota toxicity EC<sub>50</sub> pro amoxicilin 0,0037 mg/l, pro mořskou řasu *Rhodomonas salina* byla 3108 mg/l a pro sladkovodní zelenou řasu *Selenastrum capricornutum* byla zjištěna hodnota NOEC větší než 250 mg/l.

Skupina okolo Pascoea (2003) pak testovala akutní a chronickou toxicitu na žahavci nezmaru obecném (*Hydra vulgaris*). Po sedmi dnech expozice nebyl pozorován žádný efekt až do koncentrace 1,0 mg/l a po 17 dnech nebylo nepříznivě ovlivněno krmení a ani tvorba pupenů

Při testování žábřonožky *Artemia salina* jsme jako endpoint zvolili jejich nulovou pohyblivost, tj. ani dýchací pohyby. Stanovali jsme hodnoty EC<sub>50</sub>, i když se tato hodnota prakticky rovná hodnotám LC<sub>50</sub> (koncentrace, která má za následek úhyn u 50 % populace). Pro standard amoxicilinu jsme zjistili hodnotu EC<sub>50</sub> 0,6637 mmol/l (95% interval spolehlivosti 0,5794 – 0,7602 mmol/l) v temnu a s působením UVA 365 nm 0,6369 mmol/l (0,5177 – 0,7837 mmol/l). Bohužel pro Augmentin<sup>®</sup> 625 mg jsme tyto hodnoty nezískali, protože ve vyšších koncentracích působil spíše protektivně, což bylo pravděpodobně dáno působením ostatních složek tablety.

Altomare a kol. (2006) zkoumal vliv látek kontrolujících růst plísní (BCA) charakterizovaných rozdílnou chemickou povahou a mechanismem působení na *A. salina*. BCA mohou produkovat toxické metabolity, které představují riziko jak pro úrodu, tak pro životní prostředí. Testy byly provedeny v 24-jamkových testovacích destičkách. Každá jamka obsahovala 30 – 40 nauplií v 500 µl mořského roztoku. Pět mikrolitrů toxinu každého ředění bylo dáno do každé jamky. Náš test probíhal na rozdíl od jeho v 96-jamkových testovacích mikrodestičkách, přičemž každá měla obsahovat 50 µl suspenze 10 – 20 nauplií a 100 µl roztoku. Výsledky testu ukázaly, že citlivost žábřonožek na BCA byla závislá časově a na dávce.

Tabulka č. 28: (převzata od: Altomare (2006))

Sloučenina		LC <sub>50</sub> (95% interval spolehlivosti) (mmol/l)	
		24 hodin	36 hodin
Alamethicin	polypeptid	5,32 (4,14 – 6,87)	1,96 (1,53 – 2,46)
Paracelsin	polypeptid	21,26 (16,53 – 29,58)	9,66 (7,63 – 12,73)
Antiamoebin	polypeptid	19,79 (15,49 – 27,31)	8,25 (6,14 – 11,67)
Gliotoxin	epidithiodiketopiperazin	39,49 (27,96 – 61,90)	20,44 (17,28 – 24,44)
Destruxin A	cyklodipsipeptid	16,92 (13,40 – 21,67)	2,05 (3,87 – 6,61)
Oosporein	hydroxybenzochinon	nedefinováno – nejvyšší koncentrace 200 µM nebyla toxická	
Elsinochrom A	perylenchinon	20,18 (18,81 – 21,64)	15,26

Chowdhury (2005) zkoumal cytotoxicitu chloroformového extraktu a antibiotik JF-A, JF-B izolovaných z bangladéšských *Streptomyces* sp.. Hodnoty LC<sub>50</sub> pro *A. salina* byly 23,26 µg/ml pro extrakt, 18,05 µg/ml pro JF-A a 32,27 µg/ml pro JF-B. 90% úmrtnost byla pozorována při koncentracích 69,18; 50,12 a 110,91 µg/ml.

Aoyama a kol. (2007) sledoval vliv antivegetativních biocidů v barvách na lodi a jelikož se udělalo mnoho akutních testů toxicity se samotnými látkami, v tomto testu se více zaměřil na kombinovanou toxicitu *A. salina* k pyrithion zinku (ZPT), pyrithion mědi (CPT), Chlorothalonilu a Diuronu jako užívaných jako alternativa k tributyltinu.

K testu byl použit Artoxkit M a zkoumalo se 24h LC<sub>50</sub>. LC<sub>50</sub> (95% interval spolehlivosti) jednotlivých složek: Diuron 12,01 (11,42 – 12,61) mg/l; ZPT 3,17 (2,45 – 3,88) mg/l; CPT 0,83 (0,58 – 1,07) mg/l; Chlorothanonil 1,00 (0,80 – 1,20) mg/l. Kombinace ZPT a CPT měla synergistický efekt, což podle něj vyžaduje velkou pozornost, protože se v mořském prostředí může vyskytovat koexistence obou látek v důsledku transchelatace. Binární směs Diuronu s ZPT nebo CPT ukázala mnoho vzájemných efektů (synergismus, antagonismus nebo aditivní účinek) v závislosti na koncentračních poměrech.

Jelikož jsou pesticidy častou součástí životního prostředí, mohou ovlivňovat i necílové organismy, tak jako antibiotika neovlivňují pouze patogenní mikroorganismy. Akutní toxicitu a úspěšnost líhnutí *A. salina* pro čtyři organofosfátové insekticidy – acefát (ACEP), chlorpyrifos (CPP), monokrotofos (MCP), propenofos (PF) – byla studována skupinou okolo Jakka (2007). Zkoumali 50% inhibici líhnutí a LC<sub>50</sub>. CPP vyšel jako nejtoxičtější. Toxicita ve všech parametrech vyšla následovně: CPP > PF > MCP > ACEP.

Dle Amata a kol. (2002) hodnoty 24h LC<sub>50</sub> organofosfátových pesticidů s 95% jistotou byly pro *A. salina* 9,3 mg/l (1,35 – 6,34 mg/l) pro dichlorvos a 3,19 mg/l (1,35 – 6,34 mg/l) pro chlorpyrifos.

Protože jsme pracovali v testech s žábřonozkami čerstvě vylíhnutými, bylo by zajímavé zjistit, jak jsou citlivá jiná stádia jejich vývoje. Akutní toxicitu chlorpyrifosu, methylchlorpyrifosu, parathionu a methylparathionu na tři věkové třídy *A. salina* zkoumal tým okolo Barahony (1996). *A. salina* stará 24 hodin byla méně citlivá k těmto organofosfátům než 48 staré larvy, které zase naopak byly značně tolerantnější než 72 hodin stará *A. salina*, ale chlorpyrifos má stejnou toxicitu jak u 48-hodinových, tak u 72-hodinových.

Angeles-López a kol. (2007) zkoumal akutní toxicitu mexických rostlin užívaných v tradiční medicíně. Jeden den staré larvy *A. salina* přenesl do 5 ml nádobek (10 v nádobce) obsahujících suchý extrakt rostlin a solný roztok. Extrakt testoval v koncentracích 10, 100 a 1000 µg/ml. Po 24 hodinách spočítal počet přeživších. Pozitivní kontrolou byl kolchicin (LC<sub>50</sub> 25 µg/ml). Náš standardní toxin byl chlorid manganatý (EC<sub>50</sub> 0,6637 mmol/l). *Amphipteryngium adstringens*, *Iostephane heterophylla*, *Exostema caribaeum*, *Hintonia standleyana*, *Hippocratea excelsa*

a *Gnaphalium* sp. se ukázaly jako netoxické (LC<sub>50</sub> byla vyšší než 1000 µg/ml). *Brickellia veronicaefolia* (LC<sub>50</sub> 37,15 µg/ml), *Arracacia toluensis* (LC<sub>50</sub> 71,94 µg/ml), *Poliomintha longiflora* (LC<sub>50</sub> 169,04 µg/ml) a *Piper sanctum* (LC<sub>50</sub> 227,50 µg/ml) se projeví jako významně toxické k *A. salina*.

Kalka a kol. (2005) zkoumal akutní toxicitu *A. salina* pěti běžně užívaných tenzidů. Test byl veden na základě Artoxkitu M a trval 24 hodin. Endpoint byla hodnota LC<sub>50</sub>, zatímco našim byla EC<sub>50</sub>. Hodnoty LC<sub>50</sub> potvrdily vyšší toxicitu neionogenních tenzidů v porovnání s anionickými: natrium dodecylsulfát 0,142 mmol/l, natrium dodecylbenzensulfonát 0,117 mmol/l, natrium alkyltrioxyethylensulfát 0,028 mmol/l, dekaoxyethylenalkyl ether 0,00097 mmol/l, nonylfenylheptaoxyethylenalkyl ether 0,0086 mmol/l.

Artoxkit M byl užít v ekotoxikologickém screeningu Callejou (1994), kde se studovalo 50 prioritních chemikálií programu MEIC (Multicentre Evaluation of In vitro Cytotoxicity) i pomocí Rotoxkitu F.

Tabulka č. 29: (převzata od: Calleja (1994))

Vybraná léčiva	24h LC <sub>50</sub> (µmol/l)	
	<i>Artemia salina</i>	<i>Brachionus calyciflorus</i>
paracetamol	3,57	4,54
kyselina acetylsalicylová	3,32	2,89
amitriptylin	2,12	0,46
theofylin	4,65	4,20
dextropropoxyfen hydrochlorid	3,06	1,19
R-(±)-propranolol	3,19	1,00
warfarin	4,07	3,15
isoniazid	3,37	4,34
verapamil hydrochlorid	2,86	1,34
chlorochin fosfát	3,60	0,80
chinidin sulfát	2,56	1,05
chloramfenikol	3,80	3,81
amfetamin sulfát	3,61	0,98
atropin sulfát	4,35	2,67

Dále Calleja zkoumal (1993) vliv rozpouštědel na akutní toxicitu lipofilních chemikálií na *A. salina* a *B. calyciflorus* s použitím Artokitu M a Rotoxkitu F. Testoval diazepam a digoxin s anebo bez rozpouštědla (dimethylsulfoxid a ethanol).



Tabulka č. 30: (převzata od: Calleja (1993))

(μmol/l)	24h LC <sub>50</sub>	
	<i>Artemia salina</i>	<i>Brachionus calyciflorus</i>
diazepam	241	> 35,100
diazepam + DMSO	287	166
diazepam + ethanol	> 351	netestováno
digoxin	> 12,800	> 12,800
digoxin + DMSO	> 128	> 128
digoxin + ethanol	> 128	netestováno

Jelikož jsme jako rozpouštědlo použili také DMSO, ale v koncentracích 1 % a 0,5 % v nejvyšších testovacích koncentracích, mohlo by se nás toto týkat, ale z předchozích experimentů bylo zjištěno, že v takovéto koncentraci mortalitu neovlivňuje.

Někdy je žábřonka nejen druh, který umožňuje určit riziko pro životní prostředí, ale může pomoci určit i toxicitu pro jiné organismy. Iglesias Buena a kol. (2001) zjistil dobrou korelaci mezi in vivo testy rostlinných extraktů na myších a in vitro testy na *A. salina* a díky tomu je tato metoda užitečná k určení orální akutní toxicity.

Při testování *Brachionus calyciflorus* jsme používali kity pro akutní toxicitu Rotoxkit F a pro chronickou toxicitu Rotoxkit F Chronic vytvořené belgickým výrobcem MicroBioTests Inc. Jako nejvyšší koncentraci účinné látky jsme zvolili 1,089 mmol/l, přičemž tato nezpůsobila žádný efekt jak u 24-, tak u 48-hodinového testu. Úmrtnost vířníků v jednotlivých jamkách byla způsobena spíše jejich špatným stavem než působením toxikantu.

Standardní testy toxicity na *B. calyciflorus* využívají jako endpoint přežití během 24 hodin nebo asexuální reprodukci během 48 hodin. Takové testy jsme použili i my. Bohužel v přírodních ekosystémech mohou být organismy exponovány v různou dobu jejich životního cyklu. Důkazy svědčí o tom, že mnohem citlivější je sexuální reprodukce. Skupina okolo Prestona (2001) proto vyvinula 96-hodinový test toxicity na základě modifikace testů 48- a 72-hodinových a odhadl toxicitu fungicidu a dříve i herbicidu pentachlorofenolu (PCP) a mědi. Testované organismy se skládali z novorozených samic (4 – 6 hodin starých) vylíhnutých z cyst. 96-hodinový test pro PCP s *B. calyciflorus* ukázal hodnotu NOEC 10 μg/l, která byla dvacetkrát nižší než NOEC u testu trvajících 48 hodin a 120 krát nižší než u LC<sub>50</sub> testu 24 hodinového. Při

testech s mědí byl tento výsledek NOEC = 2,8 µg/l, což je sedmkrát nižší než NOEC 48 hodinového testu a devětkrát nižší než LC<sub>50</sub> u 24-hodinového testu.

Gallotti-Schmitt (2000) pro měď ve formě sulfátu získal hodnotu ve dvoudenním testu toxicity EC<sub>50</sub> 0,058 mg/l (95% interval spolehlivosti 0,05 - 0,06 mg/l).

Výsledky studie prezentované skupinou okolo Fieldse (2001) pak vyzvedávají otázku přesnosti stanovení ekologického nebezpečí po získání dat ze statických testů toxicity. Vodní organismy žijí totiž ve vodním prostředí a fluidní dynamika má důležitý vliv na odpověď vůči toxikantu. Vířníci patří do jedné ze tří hlavních skupin zooplanktonu, a proto se využívají pro standardizované testy toxicity, které jsou jako u většiny ostatních testů toxicity pod statickými podmínkami. Tým zjistil, že LC<sub>50</sub> a EC<sub>50</sub> pentachlorofenolu u *B. calyciflorus*, které ve statických podmínkách bylo 738 a 1082 µg/l, se snížilo na 262 a 136 µg/l.

Janssen (1991) zjistil, že stáří cyst od 0 do 18 měsíců nemá žádný efekt na kvalitu testů. Vzhledem k tomu, že jsme testy používali ještě před jejich expirací, jejich kvalitu by tak stáří cyst nemělo ovlivnit. Při působení látky měli nastavenou teplotu termostatu na 25 °C. Dle Janssena vyšší i nižší testovací teplota měla za následek zvýšenou citlivost vířníků na toxikanty.

Tým okolo Gallotti-Schmitta (1999) porovnával hodnoty NOEC 25 chemikálií 21 denního testu toxicity s *Daphnia magna*, který je požadovaný evropskými autoritami pro zjištění chronické vodní toxicity nových sloučenin, s testy na *B. calyciflorus*. Tyto testy vykazují méně nevýhod, zejména menší náročnost na práci, finanční náklady a potřebu krmení během testu. Test s vířníky byl poněkud méně citlivý než test s dafnií, ale korelace mezi těmito dvěma testy byla relativně dobrá. Tím se vířníci stali slibnými ekonomicky výhodnými pomůckami k screeningu chronické toxicity.

Tým Isidoriho (2005) studoval akutní a chronickou toxicitu šesti antibiotik na *Brachionus calyciflorus* pomocí stejných testů jako my. Výběr léčiv byl na základě dat získaných z monitorovacího programu v Itálii, zatímco my jsme vybírali data o spotřebě na základě MV-Aislp.

Tabulka č. 31: (převzata od: Isidori (2005))

(mg/l)	24-hodinová akutní toxicita	48-hodinová chronická toxicita
	E(L)C <sub>50</sub> (95% interval spolehlivosti)	E(L)C <sub>50</sub> (95% interval spolehlivosti)
erythromycin	27,53 (18,58 - 40,78)	0,94 (0,93 - 1,41)
oxytetracyklin	34,21 (22,19 - 52,74)	1,87 (1,19 - 2,96)
sulfomethoxazol	26,27 (16,32 - 42,28)	9,63 (7,00 - 13,25)
ofloxacin	29,88 (26,67 - 33,46)	0,53 (0,34 - 0,82)
linkomycin	24,94 (20,73 - 30,00)	0,68 (0,38 - 1,22)
klarithromycin	35,46 (26,96 - 46,63)	12,21 (10,43 - 14,72)

Chronické testy ukázaly vyšší toxicitu než akutní. Podíl toxicity akutních a chronických efektů (tzv. A/C ratio) u *B. calyciflorus*, které je od 3 (klarithromycin a sulfomethoxazol) po 56 (ofloxacin), potvrdilo to, že pro detekování vlivu léčiv na prostředí jsou lepší chronické testy.

Endoh a kol. (2005) využíval taktéž Rotoxkit F pro zjištění hodnoty EC<sub>50</sub> často používaných veterinárních antiparazitik amprolium hydrochloridu (APH), bithiniolu (BT), levamizolu hydrochloridu (LVH), pyrimethaminu (PYM) a trichlorfonu (TRC). Zjistili, že vírník byl nejvíce citlivý na BT (EC<sub>50</sub> = 0,063 mg/l) a poté na PYM s EC<sub>50</sub> = 15,0 mg/l. APH byl pro něj nejméně toxický s EC<sub>50</sub> 403 mg/l.

Barahona (2005) naopak porovnával efekty syntetických pyrethroidů, insekticidů používaných více než 20 let v zemědělství, na životní prostředí. Všechny se ukázaly jako vysoce toxické pro larvy *B. calyciflorus* (cysty získali od jiného belgického výrobce než my - Creasel Ltd., Deinze, Belgie), přičemž se ukázalo, že resmethrin (24h LC<sub>50</sub> 0,04 mg/l) a cypermethrin (24h LC<sub>50</sub> 0,08 mg/l) byly o 80,51% a 46,49% toxičtější než permethrin (24h LC<sub>50</sub> 0,22 mg/l).

Andreu-Moliner a kol. (1992a) stanovil akutní toxikologické efekty několika pesticidů na *B. calyciflorus*. Nejvyšší použité koncentrace odpovídaly organofosfátům (methylparathion, diazinon, malathion) a nejnižší organochloridům (endosulfan) a karbamátům (benthiokarb). Porovnáním hodnot LC<sub>50</sub> došel k závěrům, že endosulfan je nejtoxičtější z testovaných organofosfátových pesticidů, zatímco toxicita endosulfanu je stejná, jakou ukázal test s benthiokarbem. Z testu vyšlo, že organofosfáty jsou nejméně toxické testované pesticidy. Dále pak jeho skupina (1992b) zkoumala akutní toxicitu pesticidů endosulfanu a diazinonu na *B. calyciflorus*. LC<sub>50</sub> bylo pro endosulfan 5,15 mg/l a 29,22 mg/l pro diazinon. V jiném testu Andreu-Moliner (1991) byli vírníci vystaveni dvěma subletálními koncentracím endosulfanu (1,5 – 2,0 ppm) pro testy

bioakumulace, které trvaly 24, 48, 72 a 96 hodin. Během této doby byli krmeni řasou *Nannochloris oculata* ( $5 \cdot 10^5$  buněk/ml). Stejnou potravu pro vířníky jsme v testech užili i my. Nejvyšší akumulace pak určil 24 hodin po startu expozice při koncentraci 1,5 ppm. Ve svém dalším experimentu (1996) zabývajícím se organofosfátovým insekticidem fenitrothionem zjistil pro *B. calyciflorus* hodnotu 24h LC<sub>50</sub> 6,68 mg/l, při chronické toxicitě to byly hodnoty NOEC 1,0 mg/l a LOEC 1,6 mg/l.

Kolektiv okolo Mariíneze-Jerónima (2006) zkoumal efekty dvojmocného kadmia a šestimocného chromu na růst populace vířníků *B. calyciflorus*. Zjistili, že kadmium je pro ně přibližně stokrát toxičtější než chrom. Jako hraniční koncentrace šestimocného chromu se pro reprodukci ukázala 8 mg/l.

DellaGreca (2004) zkoumal toxicitu prednisolonu a dexamethasonu, silných protizánětlivých léčiv, a jejich fotoproduktů po expozici světlem. Vířník byl získán taktéž od firmy MicroBioTest Inc. a testoval se na základě standardizovaných testů pro Rotoxkit F, ASTM (American Society for Testing and Materials, 1991) E1440-91, přičemž se testované látky rozpouštěly v DMSO, které mělo výslednou koncentraci 0,01 % (v/v). My jsme použili v testu 0,5% roztok DMSO. Fotoprodukty byly mnohem toxičtější než parenterální léčiva (pro prednisolon byla hodnota 24h LC<sub>50</sub> 22,29 mg/l a pro dexamethason 24h LC<sub>50</sub> 48,22 mg/l), ale v řádových hodnotách je tento efekt nižší než u léčiv nacházejících se v povrchových vodách.

Skupina okolo Brixie (2006) zkoumala chronickou toxicitu rozpuštěného olova. Pro *B. calyciflorus* bylo NOEC 194 µg/l, LOEC 284 µg/l a EC<sub>20</sub> 125 µg/l.

Dle Kettrupa (2002) se vířníci a speciálně *B. calyciflorus* ukázali jako velmi výhodní k testování chronické toxicity. Mají dobrou citlivost, jednoduše se s nimi pracuje, jsou ekologicky relevantní a doba potřebná k jejich dělení je krátká. Bohužel podle výsledků našich testů se tyto výše zmíněné zkušenosti, hlavně jejich jednoduchost, neukázaly jako pravdivé. Metodika testování je velmi pracná, daná hlavně odchytem jednotlivých jedinců a jejich viditelností. V této studii pak zkoumal ve třídenním testu látky charakteru pohlavních hormonů, ethinylestradiol, nonylfenol a testosteron, na *B. calyciflorus* a jejich vliv na reprodukci. Ethinylestradiol měl po 72 hodinách EC<sub>50</sub> 4,15 µmol/l, nonylfenol 2,63 µmol/l a testosteron, který byl nejméně toxický, měl 26,3 µmol/l. My jsme chronickou toxicitu testovali během 48 hodin.

V testech toxicity představuje hořčice *Sinapis alba* zástupce kulturních plodin a vyšších rostlin vůbec. Metodikou práce jsme vycházeli z Metodického pokynu odboru odpadů MŽP ČR ke stanovení ekotoxicity odpadů. Vzhledem k tomu, že terestrické testy byly dlouhou dobu opomíjeny oproti akvatickým, není příliš zkušeností s jejich testováním.

Pokusy jsme prováděli v plastových Petriho miskách o průměru 90 mm po dobu 72 hodin. Filtrační papír jsme nasýtili 5 ml testovaného roztoku a rovnoměrně vložili 10 semen. IC<sub>50</sub> pro Augmentin® 625 mg byla 0,4999 mmol/l a pro standard jsme ze získaných dat IC<sub>50</sub> nemohli určit, jelikož se v daných koncentracích jevil spíše protektivně.

Fargašová (1994) rozložila 50 semen na filtrační papír v Petriho misce o průměru 14 cm, přičemž na každou misku použila 10 ml roztoku. Test trval 72 hodin a studoval se vliv herbicidů kromě inhibice růstu kořene (I), též vliv na jejich klíčení (G). Semena hořčice vykazovala EC<sub>50</sub> až 100krát nižší než LC<sub>50</sub>. Hodnoty LC<sub>50</sub> byly velmi vysoké a v některých případech hraničily s maximální rozpustností ve vodě:

Tabulka č. 32: (převzata od: Fargašová (1994))

(mg/l)	<i>Sinapis alba</i>	
	72h LC <sub>50</sub> (G)	72h EC <sub>50</sub> (I)
4-(indol-3-yl)octová kyselina (IAA)	200,00 (159,65 – 208,15)	4,07 (3,90 – 4,72)
2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D)	165,96 (141,58 – 195,47)	1,17 (0,95 – 1,32)
4-chloro-2-methylfenoxyoctová kyselina (MCPA)	177,83 (153,28 – 201,00)	1,58 (1,36 – 1,65)
N6-(beta 2-isopentenyl) adenosin (IPA)	156,68 (134,85 – 178,74)	4,63 (3,14 – 6,03)
1-naftyloctová kyselina (NAA)	107,16 (92,47 – 118,77)	0,38 (0,26 – 0,41)

Dle Bláhy (2006) jsou *S. alba* a *Triticum aestivum* citlivější druhy než *Phaseolus vulgaris*, který je dost užívaný v testech toxicity. Chemikálie s nejsilnějším inhibičním efektem na klíčení a růst rostlin byly fenentridin, akridin, benzo[h]chinolin a 1,10- a 1,7-fenantrolin.

Tým Grabińska-Sota (2003) studoval vliv komerčních preparátů s obsahem fenoxherbicidů, Chwastox Extra 300 SL (30% MCPA Na<sup>+</sup> + 70% nespecifických složek zakoupených od „Organika Sarzyna“) a Aminopielik 720 (68% 2,4-D NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + 32% nespecifikovaných složek obdržných od „Rokita“), na inhibici klíčení během

168 hodin. V prvním případě byla  $IC_{50}$  104,00 mg/l a v druhém 160,00 mg/l. Pro test užíli 9 cm Petriho misky a filtrační papír nasýtili 7 ml roztoku. Během prvních 72 hodin nechali semínka inkubovat ve tmě a posléze je nechali na nepřímém slunečním záření.

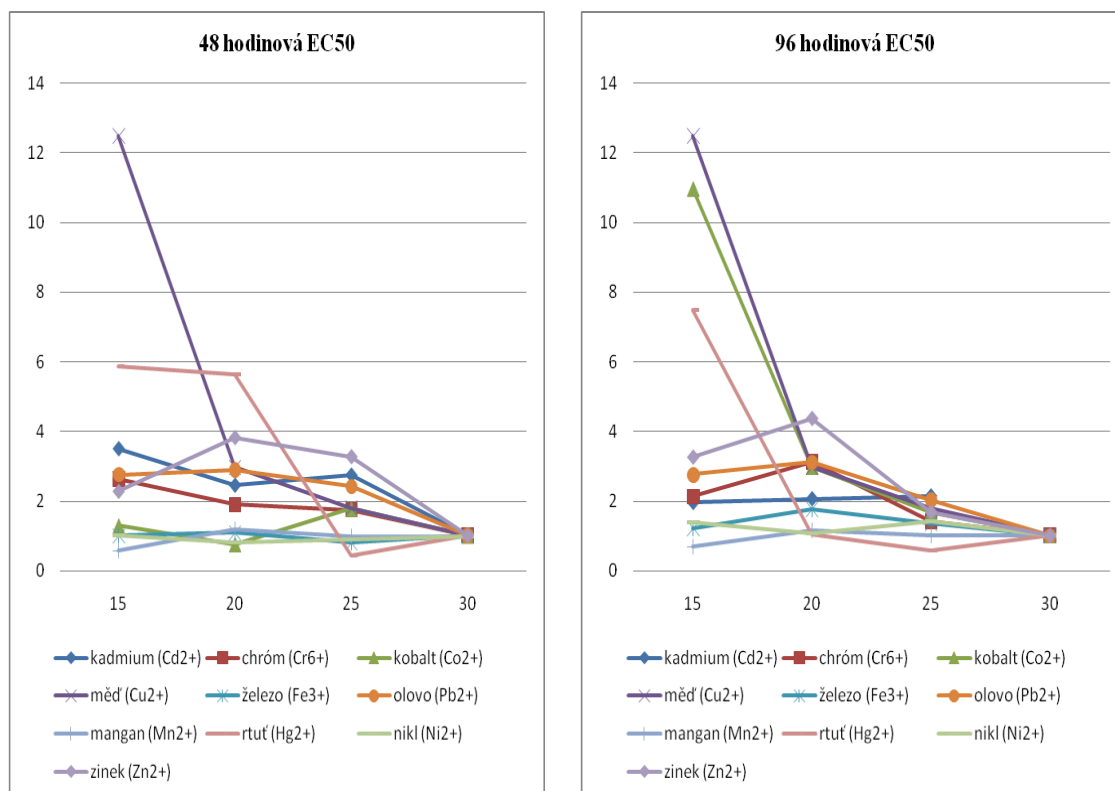
Bailly a kol. (2007) zjistil, že 10% (w/v) vodný extrakt slunečnice (*Helianthus annuus*, L. cv. Ogrodowy) a 28,4% (w/v) polyethylenglykol inhibují klíčení.

V jiném typu testu Kurki-Helasma a kol. (1998) zkoumal semena *S. alba*, která byla kultivována sedm dní na pevném médiu s živinami doplněnému o 40  $\mu\text{g/ml}$  mikrocystinu-RR. Mikrocystin-RR ovlivnil růst semenáčků ( $IC_{50} = 0,8 \mu\text{g/ml}$ ) a koncentrace větší nebo rovna 5,0  $\mu\text{g/ml}$  způsobila znetvoření rostlin.

Vzhledem k tomu, že metodika testování na nítěnce *Tubifex tubifex* je zcela originálně vyvinutou metodou skupiny okolo mgr. Jitky Vytlačilové z Katedry farmaceutické botaniky a ekologie, je těžké začlenit výsledky do světového kontextu vědy.

*Tubifex tubifex* s testovanou látkou jsme nechali v termostatu při 20 °C působit 30 minut a studovali jsme akutní toxicitu vyjádřenou  $EC_{50}$ , tj. koncentrací, která způsobí u 50 % populace toxický efekt. Délka testu byla určena na základě experimentů mgr. Vytlačilové, kdy se zjistilo, že pokud je látka fototoxická, má nejvyšší toxicitu během 30 minut. Khangarot (2002) nechal působit 10 kationtů těžkých kovů na organismus naproti tomu po dobu 48 a 96 hodin, přičemž kromě  $EC_{50}$  sledoval též  $LC_{50}$ . V této práci se zabýval působením sezónních výkyvů teploty (15, 20, 25, 30 °C) na toxicitu. Výsledky  $EC_{50}$  ukazují na to, že hodnoty (mg/l) jsou rozdílné v závislosti na teplotě, přičemž nítěnky přežívaly lépe v 15 °C než v 30 °C:

Grafy č. 38 a 39: (převzaty z přepracované tabulky vypracované: Khangarot (2002))



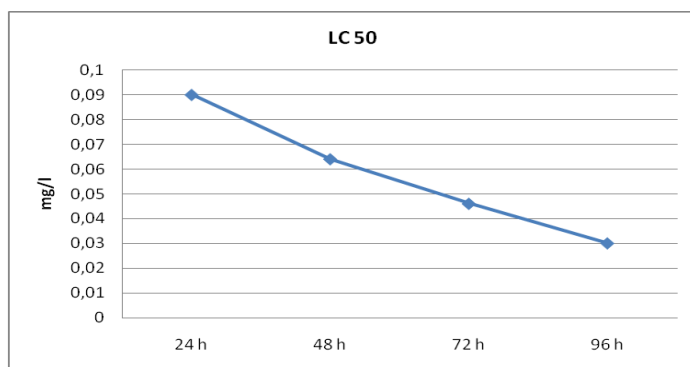
V tomto ohledu je naše zvolení teploty ideální.

Na základě hodnot 96h LC<sub>50</sub> pro *T. tubifex* Fargašová (1999) rozřídila toxicitu kovů následovně: měď(II) > měď(I) > vanad > rtuť = mangan > nikl > kadmium > chrom > molybden > olovo > cín(IV) = cín(II) > arsen. Z tohoto pořadí je evidentní, že měď je pro nítěnky nejtoxičtější kovový ion. Rozdíly našla mezi toxicitou iontů měďnatých a měďných, kdy měďnaté ionty jsou 2,5krát toxičtější.

Tým okolo Khangarota (2004) upozoroval, že se toxicita vodních organismů *T. tubifex* způsobená mědí dá překonat aminokyselinami. 96h LC<sub>50</sub> byla pro samotnou měď 0,084 mg/l, zatímco s přidáním aminokyselin histidinu, leucinu, kyseliny aspartové o koncentraci od 2 mM do 20 mM byla tato hodnota od 0,164 do 11,80 mg/l mědi. LC<sub>50</sub> pak stoupala lineárně s přidáváním aminokyselin, tzn., že měď se spojovala s těmito kyselinami.

Biagianti-Risbourg (2000) potvrdil, že *Tubifex tubifex* je vhodný pro ekotoxikologické studie, což nám výsledky pokusů potvrdily. Jako jediný organismus nám dal jednoznačné výsledky jak u léčiva, tak u standardu amoxicilinu. Také tvrdí, že není známo mnoho dat o subletální toxicitě a bioakumulaci. Hodnoty LC<sub>50</sub> kadmia klesají s rostoucím časem, tzn., že akutní toxicita roste s rostoucím časem expozice:

Graf č. 40: (převzat z přepracované tabulky vypracované Biagianti-Risbourgem (2000))



Při subchronické toxicitě pozorováním elektronovým mikroskopem zjistil, že kadmium způsobuje morfologické změny, hlavně autotomii kaudální části nítěnky.  $EC_{50}$  pak po 96 hodinách byla 0,015 mg/l. Výsledky bioakumulace odhalily, že kadmium je přijímáno nítěnkami vysoce a rychle. Schopnost akumulovat velké množství kadmia tak představuje potenciální toxikologické riziko pro predátory nítěnek, pokud se kadmium akumuluje v biodostupné formě.

Jelikož je standard amoxicilinu špatně rozpustný ve vodě, používali jsme jako pomocné rozpouštědlo kromě vody polární aprotické rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) tak, aby v nejvyšší koncentraci byla koncentrace maximálně 1%. Borek-Dohalský (2002) zjišťoval hodnotu  $EC_{50}$  *T. tubifex* směsi benzenu a ethanolu a její rozdíl od hodnoty  $EC_{50}$  jednotlivých sloučenin, přičemž  $EC_{50}$  v tomto testu byla definována jako koncentrace, která inhibuje pohyb z 50 %. Směs nakonec vykazovala odchylky hodnoty  $EC_{50}$  od hodnot  $EC_{50}$ , které předpověděl na základě testování jednotlivých složek.

Fargašová (1994) použila pro test 20 mm dlouhé nítěnky, zatímco my jsme je užili o velikosti 10 – 20 mm. Před testem herbicidů je adaptovala na podmínky ve vodném roztoku s obsahem vápníku, hořčíku, sodíku, draslíku, chloridů, sulfátů, hydrogenuhličitanů o pH 6,67 a teplotě 20 °C po dobu 24 hodin. My jsme je nechávali pouze ve vodě získané reverzní osmózou, aby se před testem detoxifikovaly. Výsledky po 96-hodinovém působení herbicidů vyjadřují též i 95% interval spolehlivosti:



Tabulka č. 33: (převzata od: Fargašová (1994))

Herbicid	<i>Tubifex tubifex</i>
	96h LC <sub>50</sub> (mg/l)
4-(indol-3-yl)octová kyselina (IAA)	97,50 (89,13 - 112,30)
2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D)	161,17 (142,83 – 200,84)
4-chloro-2-methylfenoxyoctová kyselina (MCPA)	171,00 (168,52 – 190,24)
N6-(beta 2-isopenteny) adenosin (IPA)	123,00 (114,56 – 141,87)
1-naftyloctová kyselina (NAA)	78,60 (71,60 – 97,31)

Z nich je patrné, nítěnky jsou odolné vůči vysokým koncentracím testovaných herbicidů. Vůči působení amoxicilinu jsou též nítěnky po 30 minutovém působení velmi odolné.

Cílem Bláhy a kol. (2004) bylo porovnání citlivosti 17 akutních testů toxicity třech vzorků extraktu sinic (hlavní díl představoval *Microcystis sp.*, který se podstatně lišil obsahem mikrocystinu-LR). Dobrá selektivní odpověď na toxicitu mikrocystinů byla pozorována v týdenních biotestech s máloštětinatcem *Tubifex tubifex* a vířníkem *Brachionus calyciflorus*.

## **6. Závěr**

V diplomové práci jsme si dali za cíl získat ekotoxikologická data o léčivech s obsahem amoxicilinu (Augmentin<sup>®</sup> 625 mg, Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml) a jejich fototoxicitě v porovnání se standardem nutná pro predikci účinku v životním prostředí. Jako referenční organismy jsme použili žábřonožku solnou *Artemia salina*, L., vířníka *Brachionus calyciflorus* jako zástupce z řad konzumentů, bělohořčici *Sinapis alba*, L., producenta a zástupce vyšších kulturních rostlin, a nítěnku *Tubifex tubifex*, řazenou jak do skupiny konzumentů, tak destruentů.

Experimenty s artémií jsme prováděli v 96-jamkových testovacích destičkách, které jsme spolu s léčivou látkou nechali inkubovat 24 hodin při 25 °C se spolupůsobením UVA záření (vlnová délka 365 nm) a v temnu. Po ukončení působení látky jsme spočítali uhynulé jedince *Artemia salina* a zjistili pomocí programu Prisma nelineární regresí hodnoty akutní toxicity EC<sub>50</sub>. Zjistili jsme, že Augmentin<sup>®</sup> 625 mg v nejvyšších koncentracích jak ve světelném testu, tak v temnostním působí na žábřonožku protektivně, protože vykazovala minimální úmrtnost oproti koncentracím nižším. Pravděpodobně to bylo dáno tím, že rozpuštěný léčivý přípravek s obsahem i jiných látek než jen léčivé zabíjel patogeny artémie a tak vytvářel podmínky vhodné pro přežití. Naopak vyšly výsledky standardu, který pod působením UVA paprsků vykazoval hodnotu EC<sub>50</sub> 0,6369 mmol/l (95% interval spolehlivosti 0,5177 - 0,7837 mmol/l) a bez jejich působení pak 0,6637 mmol/l (95% interval spolehlivosti 0,5794 – 0,7602 mmol/l). Z nich se dá usoudit, že UVA záření má podíl na toxicitě, protože nepatrně snižuje EC<sub>50</sub>.

*Brachionus calyciflorus* jsme testovali pomocí kitů Rotoxkitu F a Rotoxkitu F Chronic, přičemž jsme sledovali v prvním případě 24-hodinovou akutní toxicitu a v druhém chronickou toxicitu po 48 hodinách. Stejně jako u artémie jsme organismy nechali pod působením UVA záření 365 nm a v temnu v termostatu vytemperovaném na teplotu 25 °C. Vířník v nejvyšší testované koncentraci účinné látky (1,089 mmol/l) jak u Augmentinu<sup>®</sup> 625 mg, tak u standardu v žádném z testů nevykazoval významné efekty. Úmrtnost *Brachionus calyciflorus*, kterou jsme pozorovali i v kontrole, byla pravděpodobně způsobena jejich špatným stavem. Tato metoda je na našem pracovišti nová a vzhledem k malému množství zkušeností, její velké pracnosti a špatné lůživosti vířníků, jsme nebyli schopni zopakovat test třikrát.

U semen hořčice bílé *Sinapis alba*, L. jsme zjišťovali hodnoty IC<sub>50</sub>, při kterých dochází k inhibici klíčení, jen pro standard a Augmentin® 625 mg při 72-hodinovém testu bez přístupu světla a při teplotě 20 °C. Použili jsme plastové Petriho misky o průměru 9 cm s filtračním papírem nasyceným roztokem léčiva, na který jsme položili 10 semen. Hodnota IC<sub>50</sub> získaná z grafu pak pro léčivo byla 0,4999 mmol/l. Standard amoxicilinu ještě ani v koncentraci 2,70 mmol/l neposkytoval potřebná data a při druhém testování látky byly hodnoty inhibice dokonce záporné, což svědčí o tom, že se klíčům dařilo lépe (tj. vykazovali větší růst) v roztoku testované látky, než v kontrole s čistým rozpouštědlem.

S posledním organismem v našem screeningu, nítěnkou *Tubifex tubifex*, jsme nechali působit obě zvolená léčiva (Augmentin® 625 mg, Ospamox® 375 mg/5 ml) a standard, a to za působení UVA a v temnu. Nítěnky jsme testovali v 24-jamkových plastových destičkách při teplotě 20 °C. Tento organismus nám jako jediný dal ve všech testech hodnoty EC<sub>50</sub>, takže se jevil při testování jako nejvhodnější. Hodnoty EC<sub>50</sub> byly získány pomocí programu Prisma nelineární regresí:

Tabulka č. 34:

(mmol/l)	EC <sub>50</sub> bez UVA	EC <sub>50</sub> s UVA
	(95% interval spolehlivosti)	
Augmentin® 625 mg	4,567 (0,1860 – 112,1)	13,11 (9,873 – 17,40)
Ospamox® 375 mg/5 ml	21,18 (15,00 – 29,89)	25,88 (17,12 – 39,14)
Standard	110,9 (85,71 – 143,4)	98,93 (83,62 – 117,1)

Stejně jako u artémie nám dal standard, na rozdíl od léčiv, při působení UVA vyšší hodnotu EC<sub>50</sub> než v temnostní kontrole, čímž je ho možné považovat za fototoxický. Nejvíce toxický dle hodnot EC<sub>50</sub> vyšel u *Tubifex tubifex* Augmentin® 625 mg.

Podle dosažených EC<sub>50</sub> či IC<sub>50</sub> lze považovat za nejméně citlivý organismus vůči působení amoxicilinu *Tubifex tubifex*.

Pro zjištění většího množství hodnot by bylo zapotřebí některé testy více rozvinout a screening amoxicilinu doplnit o další organismy.

## Abstrakt

**Psohlavcová Zuzana, Ekotoxikologický screening vybraného antibiotika, diplomová práce**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra Farmaceutické botaniky a ekologie**

Amoxicilin je jedno z nejčastěji předepisovaných antibiotik. Patří mezi širokospektré aminopeniciliny a je z 60-75 % vylučován močí v nezměněné podobě. Prostřednictvím moče a ze skládek odpadů se pak dostává do povrchových vod, kde pak působí na necílové organismy. Při hodnocení ekotoxikologického efektu amoxicilinu jsme použili 24-hodinový test akutní toxicity na žábřonožce solné *Artemia salina*, L., vířníka *Brachionus calyciflorus* prostřednictvím Rotoxkitu F a Rotoxkitu F Chronic. Dále jsme použili 72-hodinový test inhibice klíčení semen hořčice bílé *Sinapis alba*, L. a 30-minutový test akutní toxicity s nítěnkou *Tubifex tubifex*. Použili jsme léčiva Augmentin<sup>®</sup> 625 mg, Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml. Testy probíhaly ve tmě a s působením UVA záření 365 nm a zjišťovali jsme hodnoty EC<sub>50</sub> (koncentrace, která způsobí u 50 % populace toxický efekt) pro živočichy a pro *S. alba* hodnotu IC<sub>50</sub> (inhibiční koncentrace). Nejméně citlivým organismem vůči působení amoxicilinu byla nítěnka, která se jako jediná ukázala při testování toxicity nejvhodnější, protože nám dala ve všech testech hodnoty EC<sub>50</sub>.

Klíčová slova: ekotoxicita, Augmentin<sup>®</sup> 625 mg, Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml, amoxicilin, *Artemia salina*, *Brachionus calyciflorus*, *Sinapis alba*, *Tubifex tubifex*

## **Abstract**

**Psohlavcová Zuzana, Ecotoxicological screening of the select antibiotic, diploma thesis**

**Charles University in Prague, Faculty Of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology**

Amoxicillin is one of the most frequently prescribed antibiotic. It belongs to the wide spektrum of aminopenicilin and it is excreted by diuresia in uncovered condition of 60-75%. By means of urine and from waste dumps goes to surface waters, where it operates to the not target organisms. At valuation of the ecotoxicological effect of amoxicillin there we used the 24-hours test of acute toxicity on brine shrimp *Artemia salina*, L., rotifer *Brachionus calyciflorus* by means of the Rotoxkit F and the Rotoxkit F Chronic. Next we used the 72-hours test of inhibition of white mustard *Sinapis alba*, L. germination and the 30-minutes test of acute toxicity with tubificid worm *Tubifex tubifex*. We used drugs Augmentin<sup>®</sup> 625 mg and Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml. Tests take place darkling and in action of UVA radiation 365 nm and we investigated with values of EC<sub>50</sub> (the concentration which evoke the toxic efekt by 50% of population) for animals and for *S. alba* the value IC<sub>50</sub> (the inhibitory concentration). The less sensitive organism againts incidence of amoxicillin was tubificid worm who seems to be the optimal by testing of toxicity as alone because in all tests leads to the values of EC<sub>50</sub>.

Key words: ecotoxicity, Augmentin<sup>®</sup> 625 mg, Ospamox<sup>®</sup> 375 mg/5 ml, amoxicillin, *Artemia salina*, *Brachionus calyciflorus*, *Sinapis alba*, *Tubifex tubifex*

### **Použitá literatura:**

- Alexy R.; Gartiser S.; Kümmerer K.; Urich E.: Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests. *Chemosphere*, 2007, 67(3), s. 604 – 613.
- Altomare, C.; Favilla, M.; Gallo, A.; Macchia, L.: Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44(11), s. 1922 – 1931.
- Amat, F.; Guilhermino, I.; Navarro, J. C.; Varó, I.: Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 2002, 48(6), s. 563 – 569.
- Ambrožová, J.: Mikroskopické praktikum z hydrobiologie. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2002, s. 135 – 139.
- An Image-Based Key To The Zooplankton Of The Northeast (USA) - Version 2.0. University of New Hampshire, Department of Zoology, Center for Freshwater Biology, [12. 2. 2008] – dostupné z adresy: <http://cfb.unh.edu/CFBkey/index.html>
- Andreozzi, R.; Caprio, V.; Ciniglia, C.; de Champdore, M.; Lo Giudice, R.; Marotta, R.; Zuccato, E.: Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(24), s. 6832 – 6838.
- Andreu-Moliner, E.; Fernández-Casalderrey, A.; Ferrando, M. D.: Acute Toxicity of Several Pesticides to Rotifer (*Brachionus calyciflorus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1992a, 48(1), s. 14 – 17.
- Andreu-Moliner, E.; Fernández-Casalderrey, A.; Ferrando, M. D.: Endosulfan and diazinon toxicity to the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 1992b, 27(2), s. 155 – 164.
- Andreu-Moliner, E.; Fernández-Casalderrey, A.; Ferrando, M. D.; Gamón, M.: Acute toxicity and bioaccumulation of endosulfan in rotifer (*Brachionus calyciflorus*). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology*, 1991, 100(1-2), s. 61 – 63.

- Andreu-Moliner, E.; Ferrando, M. D; Sancho, E.: Chronic toxicity of fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the cladoceran (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1996, 35(2), s. 112 – 120.
- Angeles-López, G. E.; Arriaga-Alba, M.; Castaneda-Corral, G.; Déciga-Campos, M.; Mata, R.; Navarrete, A.; Rivero-Cruz, I.: Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 110(2), s. 334 – 342.
- Aoyama, I.; Koutsaftis, A.: Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment*, 2007, 387(1-3), s. 166 – 174.
- Bailly, C.; Bogatek, R.; Côme, D.; Corbineau, F.; Gniazdowska, A.; Oracz, K.: Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *Journal of Chemical Ecology*, 2007, 33(2), s. 251- 264.
- Barahona, M. V.; Sánchez-Fortún, S.: Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. *Chemosphere*, 2005, 59(4), s. 553 – 559.
- Barahona, M. V.; Sánchez-Fortún, S.; Sanz, F.: Acute toxicity of several organophosphorous insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2-PAM on *Artemia salina* larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1996, 31(3), s. 391 – 398.
- Baron E. D.; Lankerani, L.: Photosensitivity to Exogenous Agents. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 2004, 8(6), s. 424 – 431.
- Bednář, J.: Pozoruhodné jevy v atmosféře. Academia, Praha, 1989, s. 263.
- Biagianti-Risbourg, S.; Bouché, M. L.; Habets, F.; Vernet, G.: Toxic effects and bioaccumulation of cadmium the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 46(3), s. 246 – 251.
- Bláha, L.; Feldmannová, M.; Hilscherová, K.; Paková, V.: Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(12), s. 3238 – 3245.



- Bláha, L.; Maršálek, B.: Comparison of 17 biotests for detection of cyanobacterial toxicity. *Environmental Toxicology*, 2004, 19(4), s. 310 – 317.
- Borek-Dohalský, V.; Feltl, L.; Reitmajer, J.; Rucki, M.; Tichý, M.: Risk assessment of mixtures: possibility of prediction of interaction between chemicals. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2002, 75, s. 133 – 136.
- Boule, P. et al.: *Environmental Photochemistry. The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, 1999, s. 359.
- Brix, K. V.; Gerdes, R. M.; Grossell, M.: Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates – *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans*, and *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(1), s. 97 – 104.
- Calleja, M. C.; Geladi, P.; Persoone, G.: Human acute toxicity of the first 50 MEIC chemicals by a battery of ecotoxicological tests and physicochemical properties. *Food and Chemical Toxicology*, 1994, 32(2), s. 173 – 187.
- Calleja, M. C.; Persoone, G.: The influence of solvents on the acute toxicity of some lipophilic chemicals to aquatic invertebrates. *Chemosphere*, 1993, 26(11), s. 2007 – 2022.
- DellaGreca, M.; Fiorentino, A.; Isidori, M.; Lavorgna, M.; Previtera, L.; Rubino, M.; Temussi, E.: Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere*, 2004, 54(5), s. 629 – 637.
- Endoh, Y. S.; Yoshimura, H.: Acute toxicity to freshwater organisms of antiparasitic drugs for veterinary use. *Environmental Toxicology*, 2005, 20(1), s. 60 – 66.
- Fargašová, A.: Comparative study of plant growth hormone (herbicide) toxicity in various biological subjects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1994, 29(3), s. 359 – 364.
- Fargašová, A.: Ecotoxicology of metals related to freshwater benthos. *General Physiology and Biophysics*, 1999, Spec. No. 18, s. 48 – 53.
- Fields, D. M.; Preston, B. L.; Snell, T. W.; Weissburg, M. J.: The effects of fluid motion on toxicant sensitivity of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquatic Toxicology*, 2001, 52(2), s. 117 – 131.

- Gallotti-Schmitt, S.; Léonard, M.; Papantoniou, C.; Radix, P.; Roman, G.; Saouter, E.; Thiébaud, H.; Vasseur, P.: Comparison of *Brachionus calyciflorus* 2-D and Microtox registered chronic 22-H tests with *Daphnia magna* 21-D test for the chronic toxicity assessment of chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, 18(10), s. 2178 – 2185.
- Gallotti-Schmitt, S.; Léonard, M.; Papantoniou, C.; Radix, P.; Roman, G.; Saouter, E.; Thiébaud, H.; Vasseur, P.: Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 47(2), s. 186 – 194.
- Grabińska-Sota, E.; Kalka, J.; Wiśniowska, E.: Toxicity of selected synthetic auxines - 2,4-D and MCPA derivatives to broad-leaved and cereal plants. *Crop Protection*, 2003, 22(2), s. 355 – 360.
- Chowdhury, R.; Mazid, M. A.; Musawwir, F.; Rashid, R.B.: Antibiotic principles from a *Streptomyces* species and their sub-acute toxicity studies on hepatic, renal and haemopoietic system of rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 18(3), s. 1 – 7.
- Iglesias Buena, L.; Guerra Sardinias, I.; Lagarto Parra, A.; Silva Yhebra, R.: Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 2001, 8(5), s. 395 – 400.
- Isidori, M.; Lavorgna, M.; Nardelli, A.; Parrella, A.; Pascarella, L.: Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organism. *Science of the Total Environment*, 2005, 346, s. 87 – 98.
- Jahodář, L.: *Farmakobotanika – semenné rostliny*. Karolinum, Praha, 2006, s. 75 – 77.
- Jakka, N. M.; Kavitha, P.; Sridhar, V.; Usman, P. K.; Venkateswara Rao, J.: Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 53(2), s. 227 – 232.
- Janssen, C.; Moffat, B. D.; Persoone, G.; Snell, T. W.: Acute toxicity tests using rotifers IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1991, 21(3), s. 308 – 317.

- Jirků, J.; Švagr, A.: Test toxicity při semichronické expozici vůči okřehku menšímu (*Lemna minor*, L.) - laboratorní návod č. 4. VŠCHT Praha, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav chemie ochrany prostředí, Praha, 2003
- Kafka, Z.; Punčochářová, J.: Biotesty a jejich aplikace v analytice životního prostředí. Chemické listy, 1999, 93, s. 604 – 606.
- Kalka, J.; Liwarska-Bizukojc, E.; Malachowska-Jutysz, A.; Miksch, K.: Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. Chemosphere, 2005, 58(9), s. 1249 – 1253.
- Kettrup, A.; Radix, P.; Schramm, K. W.; Severin, G.: Reproduction disturbance of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disrupters. Chemosphere, 2002, 47(10), s. 1097 – 1101.
- Khargarot, B. S.; Rathore, R. S.: Effects of temperature on the sensitivity of sludge worm *Tubifex tubifex* Müller to selected heavy metals. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 53(1), s. 27 – 36.
- Khargarot, B. S.; Rathore, R. S.: Protective action of 24 amino acids on the toxicity of copper to freshwater tubicid worm *Tubifex tubifex* Müller. Water, Air, & Soil Pollution, 2004, 157(1-4), s. 53 –63.
- Knight, D. J.; Thomas, M. B.: Practical Guide to Chemical Safety. Rapra Technology Limited, 2003, s. 63 – 86.
- Kočí, V.: Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. Chemické listy, 2006, 100, s. 882 – 888.
- Kočí, V.; Rakovnický, T.; Švagr, A.: Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba* - laboratorní návod č. 3. VŠCHT Praha, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav chemie ochrany prostředí, Praha, 2001a.
- Kočí, V.; Rakovnický, T.; Švagr, A.: Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina* – laboratorní návod č. 6. VŠCHT Praha, Fakulta technologie ochrany prostředí, Ústav chemie ochrany prostředí, Praha, 2001b.
- Kümmerer, K.: Pharmaceuticals in the Environment. Springer-Verlag, Berlin, 2001, s. 143 – 157.

- Kurki-Helasmo, K.; Meriluoto, J.: Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon*, 1998, 36(12), s. 1921 – 1926.
- Lutzhof, H. H.; Halling-Sorensen, B.; Jorgensen, S. E.: Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 36(1), s. 1 – 6.
- Marínez-Jerónimo, F.; Nandini, S.; Ramírez-Pérez, T.; Sarma, S. S.: Effect of cadmium and chromium toxicity on the demography and population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 2006, 41(4), s. 543 – 558.
- Metodický pokyn č. 6 odboru odpadů MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů. Ministerstvo životního prostředí České republiky, Odbor odpadů, Praha, 2003.
- Nathanson, S.; Moreau, E.; Merlet-Benichou, C.; Gilbert, T.: In utero and in vitro exposure to beta-lactams impair kidney development in the rat. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2000, 11(5), s. 874 – 884.
- OECD Guidelines for Testing Chemicals 211 (1998): *Daphnia magna* Reproduction Test.
- OECD Guidelines for Testing Chemicals 207 (1984): Earthworm, Acute Toxicity Tests.
- Pascoe D.; Karntanut W.; Muller C. T.: Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, 2003, 51(6), s. 521 – 528.
- Preston, B. L.; Snell, T. W.: Full life-cycle toxicity assessment using rotifer resting egg production: implication for ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 2001, 114(3), s. 399 – 406.
- Prokeš J. a kol.: *Základy toxikologie I. Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Univerzita Karlova, Karolinum, Praha, 1997, s. 165.
- ROTOXKIT F. Rotifer Toxicity Screening Test for Freshwater - Standard Operational Procedure. MicroBioTest Inc., Nazareth, Belgium.

ROTOXKIT F CHRONIC. Chronic Toxicity Test for Freshwater - Standard Operational Procedure. MicroBioTest Inc., Nazareth, Belgium.

Říhová Ambrožová, J.: Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník [on-line]. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, [20. 12. 2007] – dostupné z adresy: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.copyright.htm](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.copyright.htm)

Sedlák, E.: Zoologie bezobratlých. Masarykova univerzita v Brně, Brno – Kraví hora, 2003, s. 337.

Skládanka, J.: Multimediální učební texty pícinářství. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav výživy zvířat a pícinářství, Oddělení pícinářství, Brno, 2006.

Směrnice komise 2000/33/ES o sblížování právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek (Revidovaný překlad právního předpisu Evropských společenství), 2000.

Snell, T. W.; Moffat B. D.: A 2-D life-cycle test with the rotifer *Brachionus calyciflorus*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 1992, 11(9), s. 1249 – 1257.

Sören, T.-B.: Pharmaceutical antibiotic compounds in soil – a review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2003, 166(2), s. 145 – 167.

Tverskoj, P. N.: Optické, elektrické a akustické jevy v atmosféře. Naše vojsko, Praha, 1955, s. 89.

Vanhaecke, P; Persoone, G.; Claus, C.; Sorgeloos, P.: Proposal for a short term toxicity test with *Artemia* nauplii. Ecotoxicology and Environment Safety, 1981, 5(3), s. 382 – 387.

- elektronické zdroje:

DRUGDEX<sup>®</sup> Evaluations

Mikro-verze AISLP – ČR 2007.3 pro MS Windows.

Mikro-verze AISLP – ČR 2008.1 pro MS Windows.

[sweb.cz/ekotoxikologie/](http://sweb.cz/ekotoxikologie/) - VŠCHT Praha, Laboratoř ekotoxikologie Ústavu chemie ochrany prostředí

USP DI<sup>®</sup> Drug Information for the Health Care Profesional

[www.BioLib.cz](http://www.BioLib.cz)

[www.captain.at/artemia](http://www.captain.at/artemia)

[www.ekonox.cz](http://www.ekonox.cz)

[www.faf.cuni.cz/daidalea](http://www.faf.cuni.cz/daidalea)

[www.reach.cz](http://www.reach.cz)

[www.rotifera.cz](http://www.rotifera.cz) – autoři: Miloslav Devetter, Michal Šorf, 2006

[www.sukl.cz](http://www.sukl.cz) – Státní ústav pro kontrolu léčiv

[www.wikipedia.cz](http://www.wikipedia.cz)